

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



**Identificación de reguladores del factor derivado del epitelio  
pigmentario en la progresión maligna del melanoma humano**

**Asunción Fernández Barral**

**Madrid, 2012**





**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Identificación de reguladores del factor derivado del epitelio  
pigmentario en la progresión maligna del melanoma humano**

**Asunción Fernández Barral  
Licenciada en Biología y Bioquímica**

**Directora de tesis:  
Benilde Jiménez Cuenca**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad Autónoma de Madrid**



Benilde Jiménez Cuenca, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica de la  
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA: que Dña. Asunción Fernández Barral, Licenciada en Biología y Bioquímica  
por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación  
titulado:

Identificación de reguladores del factor derivado del epitelio pigmentario en la progresión  
maligna del melanoma humano

Y que éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente y la originalidad y  
calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado  
de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado.

Madrid, 31 de mayo de 2012

Benilde Jiménez Cuenca





## AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar dándole las gracias a la Dra. Benilde Jiménez, porque vio en mí un potencial que no creí poseer y me enseñó, no sólo a usar la pipeta, sino también a pensar. Gracias por guiarme durante todos estos años, por demostrarme que un resultado positivo compensa meses de frustrantes experimentos fallidos y por dejarnos reconvertir el laboratorio en nuestra segunda casa dándole un toque de humor a cada hueco libre de pared.

Gracias a Jose, porque siempre será el más *danger* y esta tesis es casi tan suya como mía. Trabajar a su lado ha sido todo un privilegio. Agradecerle su ayuda y paciencia, las celebraciones adelantadas de *papers* y su contribución a la causa del buen gusto musical del laboratorio neutralizando el ruido proveniente de la radio del 252.

A mis compañeros de laboratorio. A Bea y Valentí, porque ha sido un auténtico placer compartir con ellos grandes momentos tanto dentro como fuera del IIB. Gracias a Sara, porque se le echa de menos en el labo más de lo que cree (aunque no sea rival para mí en ciertos juegos de mesa). A toda la gente que pasó fugazmente por el 251 Patricia, Fernando, Isa y en la última etapa Raquel, porque sin ellos la historia del laboratorio estaría incompleta. A Laura, que es capaz de conseguir todo lo que se proponga, y a nuestra última incorporación Pablo, que espero que recuerde con una sonrisa el tiempo que pase con nosotros.

Dar las gracias al grupo hipóxico. A Luis del Peso, porque independientemente de lo ocupado que esté siempre tiene un hueco para ofrecerte su ayuda o debatir los entresijos de *Sterling, Cooper, Draper & Pryce*. Muy especialmente a mis *cuquis* Amaya y Nuria, porque sin duda son lo más grande; y a su relevo las *chuchis* Mery y Laura, dignas sucesoras del espíritu 252. Con todas ellas he aprendido cosas tan útiles en esta vida como hacer tierra comestible ó saber bailar la vaina loca. También agradecer a Marisa, Diego y en la última etapa a Olga por animar día a día el laboratorio.

A toda la gente del laboratorio 231, porque siempre están dispuestos a prestarnos cualquier tipo de ayuda. En especial a Fabio por endulzar el laboratorio y a Toño, porque siempre nos contagia de su alegría y sin él es más que probable que el 251 muriera de sed.

A toda la gente del IIB con la que he tenido el placer de compartir aventuras y desventuras: Ruth, Ángeles, Oscar, Ana Rosa, Eva, Rafa, Josué, Irene, Raúl, Vero, Alberto... gracias por los buenos momentos vividos. A Vero por sufrir conmigo penas de predoctoral y a Zambrano por ser el *fucking master*. Al grupo de Ignacio Palmero por iniciarme en el mundo de la senescencia y no morir en el intento. A José González, porque no hay día que no me sorprenda con alguna de sus historias. A Jaime Renart, por tener abierta la puerta de su despacho para gente con muchas dudas como yo y por aventurarse conmigo en la infructuosa aventura de los polisomas.

A toda la gente de servicios del IIB, sin su ayuda no hubiera sido capaz de llegar a escribir estos agradecimientos, especialmente a Diego y Carlos, que me han visto entrar por las puertas del centro todos los días y se han mostrado benévolos en mis despistes de tarjeta.

Gracias también al Dr. Vladimir Botchkarev que me acogió en su laboratorio en Bradford como una más y cuya ayuda supuso un importante estímulo en mi proyecto.

A Erica y José Luis Rodríguez-Peralto del Hospital 12 de Octubre, porque es un placer colaborar con ellos y me han enseñado mucho del lado patológico de la ciencia.

Al grupo de la Dra. Marisol Soengas en el CNIO, en especial a Lisa por estar dispuesta a ayudarme en cualquier momento y compartir conmigo las malas experiencias con los melanocitos.

A mis chicos de Biología de la UNAV, porque empezamos juntos compartiendo la bonita utopía del biólogo de poder vivir de esto y finalmente parece que lo estamos consiguiendo. Gracias a Rodrigo, Rubén, Sergio, Burgaleta, Diego, Bea, Ruth, Cris, Nerea, Amaia e Itziar por todos los años juntos; y en especial a Sandra, porque sin ella CasaChón no es lo mismo.

A mi grupo lúdico-científico: Loqui, Biola y mi fusión preferida, Corajo. Chicas, siempre nos quedará Alicante, la gogó y Brian Adams en cassette.

A toda mi gente ajena al mundo de la ciencia y que todavía no sabe qué es lo que hago en el laboratorio para estar allí tanto tiempo sin cobrar horas extra. A mi Castaña, porque con mirarme ya sabe lo que pienso. A mi peligrosa Raquel, por seguir ahí tantos años. A mis pilares, mis grandes reyes Costas, Gato, Dani y Leti, porque nuestra historia sólo puede ser contada a modo de banda sonora de dj Fresh. Y gracias al *Hunter* por demostrarme que en este mundo todavía existen mamuts que pueden cazarse y servirse en la mesa con boletus.

Por último, agradecerle absolutamente todo a mi familia. En especial a mis padres, porque cuando su hija pequeña les dijo que quería estudiar biología, no sólo no se dejaron vencer por el pánico, sino que pusieron todos los medios para que pudiera conseguir mis metas. Gracias.

La realización de esta Tesis Doctoral ha estado financiada por una beca de Formación de Personal Investigador JAE del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y por los proyectos SAF-2007-62292 y SAF-2010-19256 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## RESUMEN

El Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) es una glicoproteína de secreción que presenta una potente acción anti-tumoral en varios tipos de cánceres. Resultados previos del laboratorio mostraron que PEDF se expresa a niveles elevados en los melanocitos de la piel y en células de melanoma caracterizadas como poco agresivas. Además demostramos que la pérdida de expresión de PEDF promueve la adquisición de propiedades migratorias e invasivas en células de melanoma, y les confiere la capacidad de formar redes sanguíneas (angiogénesis) y vasculogénicas (*vasculogenic mimicry*); características que determinan un aumento de la capacidad metastásica *in vivo* en modelos de ratón.

En este trabajo confirmamos que existe una pérdida de expresión de PEDF durante la progresión maligna del melanoma humano usando grupos de biopsias representativas de los diferentes estadios de la progresión del melanoma. Sorprendentemente también observamos que en un porcentaje significativo de *naevi* se ha perdido la expresión de PEDF. Demostramos que la senescencia inducida por oncogenes en melanocitos primarios conduce a la pérdida de expresión de PEDF. Este resultado sugiere que la senescencia que caracteriza a los melanocitos que componen el *naevus* podría ser responsable de los bajos niveles de expresión de PEDF detectados en estas lesiones benignas.

Encontramos que PEDF y el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) se expresan a niveles elevados en líneas celulares de melanoma poco agresivas, mientras que su expresión se pierde en líneas celulares de melanoma invasivas o muy agresivas. En consonancia con estos resultados observamos una correlación directa entre los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* en biopsias de melanoma humano. Además, la expresión de PEDF disminuye a nivel de mRNA y proteína al silenciar MITF en líneas de melanoma poco agresivas. Estos resultados identifican a MITF como un regulador de PEDF en células de melanoma. Asimismo, encontramos tres secuencias putativas de unión de MITF dentro del primer intrón de *SERPINF1* (gen de PEDF); lo que sugiere que MITF podría ser un regulador transcripcional directo de PEDF.

Observamos que en cultivos primarios de melanocitos y líneas de melanoma poco agresivas, las bajas concentraciones de oxígeno producen un descenso de la proteína PEDF mediante un proceso de degradación vía autofagia. De esta forma, la aparición de regiones hipóxicas intratumorales podría promover la disminución de expresión de PEDF, condición necesaria para que las células adquieran características más agresivas que permitan la diseminación metastásica.

En esta Tesis hemos identificado diversos mecanismos responsables de la reprogramación de PEDF durante la progresión maligna del melanoma humano, los cuales apoyan adicionalmente la relevancia de PEDF en el control de la malignización del melanoma.





## ABSTRACT

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a secreted glycoprotein that displays a potent antitumor activity in many types of cancers. A previous study of our group showed that PEDF is expressed at high levels in skin melanocytes and poorly aggressive melanoma cells. We demonstrated that loss of PEDF expression augmented the migratory and invasive capability of melanoma cell lines and enables them to form blood vessels (angiogenesis) and vasculogenic networks (*vasculogenic mimicry*); which translated into an augmented *in vivo* metastatic potential in mouse models.

In this study we confirm the loss of PEDF expression during the malignant progression of human melanoma using cohorts of biopsies representative of the different states of melanoma progression. Unexpectedly, we found that PEDF expression is lost in a high number of *naevi*. We also demonstrated that oncogene induced senescence in primary melanocytes leads to the loss of PEDF expression. This result suggested that the characteristic senescence of melanocytes in *naevus* could be responsible of the loss of PEDF expression in these benign lesions.

We found that PEDF and the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) are highly expressed in poorly aggressive melanoma cell lines and their expression is lost in invasive or highly aggressive melanoma cell lines. In agreement with this result, we found a direct correlation between *PEDF* and *MITF* mRNA levels in human melanoma biopsies. Furthermore, PEDF expression is downregulated at mRNA and protein levels in MITF-knocked down melanoma cell lines. These results identify MITF as a regulator of PEDF in melanoma cells. We found three putative binding sequences of MITF in the first intron of *SERPINF1* (PEDF gene), which suggests that MITF could be a direct transcriptional regulator of PEDF.

In primary melanocytes and poorly aggressive melanoma cell lines, low oxygen concentrations downregulated PEDF protein through degradation by autophagy. Therefore, hypoxic intratumoral regions could promote loss of PEDF expression; a requirement for the acquisition of a more aggressive potential by melanoma cells that will allow metastatic dissemination.

In this Thesis we have identified several mechanisms responsible for PEDF reprogramming during melanoma progression, which further support the relevance of PEDF in the control of melanoma malignization.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTARIO .....</b>	<b>7</b>
1.1. Efectos funcionales de PEDF .....	8
1.2. PEDF y cáncer.....	9
1.2.1. Efectos anti-tumorales indirectos .....	10
1.2.2. Efectos anti-tumorales directos .....	11
1.3. PEDF y melanoma .....	12
1.4. Receptores de PEDF .....	14
<b>2. MELANOMA .....</b>	<b>15</b>
2.1. Criterios de clasificación del melanoma cutáneo .....	16
2.1.1. Clasificación histopatológica.....	16
2.1.2. Clasificación molecular. Modelo del <i>phenotype switching</i> .....	17
2.2. Moléculas, vías de señalización y señales del microentorno implicadas en el desarrollo del melanoma .....	19
2.2.1. Genes implicados en el melanoma familiar.....	20
2.2.2. Rutas MAPK y PI(3)K .....	20
2.2.3. Factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF).....	22
2.2.4. Hipoxia .....	23
2.2.5. Autofagia .....	25
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
1. Cultivo celular.....	33
2. Obtención de cultivos primarios de melanocitos .....	34
3. Hipoxia.....	35
4. Plásmidos .....	35
5. Generación de partículas lentivirales .....	37
6. Generación de partículas retrovirales .....	38
7. Generación de líneas celulares de expresión transitoria o estable .....	38
7.1. Transducción por infección lentiviral .....	38
7.2. Transducción por infección retroviral .....	39
7.3. Transfección de células .....	39
8. Ensayos reporteros de UTR.....	39
9. Análisis de proteínas.....	39
9.1. Preparación de medios condicionados de cultivos celulares.....	39
9.2. Extracción de proteínas celulares .....	40
9.3. Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western blot</i> .....	40
10. Histología e inmunohistoquímica .....	41
10.1. Realización de matrices tisulares o <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	41
10.2. Inmunohistoquímica en bloques de parafina.....	42
10.3. Valoración de los TMA .....	43
11. Análisis de RNA .....	43
11.1. Extracción de RNA total .....	43
11.2. RT-PCR cuantitativa .....	44
11.3. Gradientes de polisomas .....	45
12. Ensayos de metaloproteinasas .....	45

<b>13. Ensayos de proliferación celular .....</b>	<b>45</b>
13.1. Incorporación de EdU.....	45
13.2. Incorporación de BrdU .....	46
<b>14. Ensayo de actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-Gal).....</b>	<b>46</b>
<b>15. Análisis estadístico de los datos .....</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>1. EXPRESIÓN DE PEDF EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DEL MELANOMA .....</b>	<b>51</b>
1.1. En biopsias humanas, la expresión de PEDF disminuye durante la progresión maligna del melanoma.....	51
1.2. La expresión de PEDF disminuye en el <i>naevus</i> intradérmico.....	59
<b>2. FACTORES REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE PEDF EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DEL MELANOMA HUMANO.....</b>	<b>61</b>
2.1. Senescencia.....	61
2.1.1. En cultivos primarios de melanocitos, la inducción de senescencia por HRAS <sup>G12V</sup> regula negativamente la expresión de PEDF.....	61
2.1.2. La inducción de senescencia por HRAS <sup>G12V</sup> en fibroblastos inmortalizados regula negativamente los niveles de PEDF .....	63
2.2. MITF .....	65
2.2.1. En biopsias humanas de melanoma observamos una correlación positiva entre la expresión de MITF y PEDF .....	66
2.2.2. En líneas de melanoma, MITF regula a PEDF a nivel de mRNA y proteína.....	67
2.2.3. En líneas de melanoma, PEDF es regulado a nivel transcripcional por MITF.....	69
2.3. Hipoxia .....	73
2.3.1. La hipoxia reduce la expresión de PEDF a nivel de proteína en cultivos primarios de melanocitos y en líneas de melanoma .....	73
2.3.2. La bajada de expresión de PEDF en hipoxia es un proceso dependiente de las PHDs e independiente de HIF1α .....	76
2.3.3. La disminución de los niveles de expresión de PEDF en hipoxia no es un proceso mediado por las UTRs.....	80
2.3.4. La regulación de PEDF en hipoxia no es debida a un proceso de degradación vía proteasoma o metaloproteinasas.....	84
2.3.5. La disminución de los niveles de proteína de PEDF en hipoxia es debida a un proceso de degradación vía autofagia.....	85
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>89</b>
<b>1. La expresión de PEDF disminuye en la progresión maligna del melanoma. Estudio en biopsias de melanoma humano .....</b>	<b>91</b>
<b>2. Identificación de factores reguladores de la expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma humano .....</b>	<b>94</b>
2.1. Pérdida de expresión de PEDF en el <i>naevus</i> . Implicación de la senescencia inducida por oncogenes (OIS) .....	94
2.2. Reprogramación de PEDF en la progresión maligna del melanoma. Influencia de MITF y del microentorno en su regulación.....	96
<b>3. Regulación de PEDF durante la progresión maligna del melanoma .....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>125</b>

## **ABREVIATURAS**



<b>(PLA<sub>2</sub>)<math>\zeta</math></b> : fosfolipasa A2 independiente	<b>IL8</b> : interleuquina 8
<b>67LR</b> : Receptor laminina 67 kDa	<b>LC3</b> : proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
<b>Ang-2</b> : angiopoyetina 2	<b>M254</b> : medio 254
<b>ATGL</b> : triglicérido lipasa adiposa	<b>MAPK</b> : proteínas quinasas activadas por mitógenos
<b>Baf.A1</b> : bafilomicina A1	<b>MC</b> : medio condicionado
<b>bFGF</b> : factor de crecimiento de fibroblastos tipo básico	<b>MC1R</b> : receptor de la hormona estimuladora de melanocitos
<b>bHLH</b> : factores tipo básico hélice-lazo-hélice	<b>MG132</b> : inhibidor del proteasoma MG132
<b>BNIP3</b> : proteína de interacción 3 de BCL2/adenovirus E1B de 19kDa	<b>MGM-4</b> : medio de crecimiento de melanocitos 4
<b>BRAF</b> : homólogo B1 del oncogen viral del sarcoma murino v-raf	<b>MITF</b> : factor de transcripción asociado a microftalmia
<b>BrdU</b> : 5-bromo-2'-deoxiuridina	<b>MMP</b> : metaloproteinasas
<b>c-FLIP</b> : proteína inhibidora similar a FLICE	<b>MOI</b> : multiplicidad de infección
<b>C-ter</b> : extremo carboxilo terminal	<b>mTOR</b> : quinasa de mamífero diana de rapamicina
<b>CDK2</b> : inhibidor quinasa dependiente de ciclina 2	<b>MYC</b> : homólogo del oncogen viral de la mielocitomatosis aviar v-myc
<b>CDK4</b> : inhibidor quinasa dependiente de ciclina 4	<b>N-ter</b> : extremo amino terminal
<b>CDKN2A</b> : inhibidor quinasa dependiente de ciclina 2A	<b>NF-kB</b> : factor nuclear kappa-B
<b>ChIP</b> : inmunoprecipitación de cromatina	<b>NHEM</b> : melanocitos humanos normales embrionarios
<b>CMV</b> : citomegalovirus	<b>NRAS</b> : homólogo del neuroblastoma del oncogen viral ras
<b>COL4A2</b> : colágeno tipo4, alfa 2	<b>OIS</b> : senescencia inducida por oncogenes
<b>CSC</b> : <i>cancer stem cell</i>	<b>PBS</b> : tampón fosfato salino
<b>C<sub>t</sub></b> : ciclo establecido como umbral de detección ( <i>threshold cycle</i> )	<b>PEDF</b> : factor derivado del epitelio pigmentario
<b>DAPI</b> : 4',6-diamidino-2fenilindol	<b>PEDF-R<sup>A</sup></b> : receptor con funciones angiogénicas de PEDF
<b>DE</b> : desviación estándar	<b>PEDF-R<sup>N</sup></b> : receptor con funciones neurotróficas y neuroprotectoras de PEDF
<b>DMEM</b> : medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	<b>PEDF<sub>e</sub></b> : PEDF extracelular
<b>DMOG</b> : dimetiloxaloglicina	<b>PEDF<sub>i</sub></b> : PEDF intracelular
<b>DTT</b> : ditioneitol	<b>PHD</b> : prolilhidroxilasas
<b>EdU</b> : 5-etinil-2-deoxiuridina	<b>PI(3)K</b> : fosfoinositol 3-OH-quinasa
<b>EGF</b> : factor de crecimiento epidérmico	<b>PMSF</b> : fluoruro de fenil metil sulfonilo
<b>(E)GFP</b> : proteína fluorescente verde mejorada	<b>PREX2</b> : factor 2 de intercambio de Rac dependiente de PI(3)K
<b>EMT</b> : <i>epithelial-mesenchymal transition</i>	<b>PTEN</b> : homólogo de fosfatasa y tensina
<b>EPC-1</b> : <i>early population doubling cDNA-1</i>	<b>PVDF</b> : fluoruro de polilvinilideno
<b>ER</b> : retículo endoplasmático	<b>RB</b> : retinoblastoma
<b>ERK</b> : quinasa regulada por señales extracelulares	<b>RBP</b> : proteínas de unión al RNA
<b>FACS</b> : separación celular activada por fluorescencia	<b>RCL</b> : <i>reactive centre loop</i>
<b>FBS</b> : suero fetal bovino	<b>RGP</b> : melanoma en fase de crecimiento radial
<b>GAPDH</b> : gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<b>rhuPEDF</b> : proteína recombinante humana de PEDF
<b>GM6001</b> : inhibidor de metaloproteinasas GM6001	<b>RPE</b> : células del epitelio pigmentario de la retina
<b>HGF</b> : factor de crecimiento de hepatocitos	<b>rpm</b> : revoluciones por minuto
<b>HIF</b> : factor inducible por hipoxia	<b>RPMI</b> : medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Insitute</i>
<b>HGMS</b> : suplemento de crecimiento de melanocitos humanos	<b>SCF</b> : factor de células <i>stem</i>
<b>HRAS</b> : homólogo del oncogen viral del sarcoma de rata h-ras	
<b>HRE</b> : elementos de respuesta a la hipoxia	

## Abreviaturas

**SDS:** dodecil sulfato sódico  
**SERPINF1:** inhibidor de serin-proteasas, miembro F1 (PEDF)  
**shHIF1 $\alpha$ :** lentivirus con secuencia de interferencia específica de HIF1 $\alpha$   
**shLC3:** lentivirus con secuencia de interferencia específica de LC3  
**shMITF:** lentivirus con secuencia de interferencia específica de MITF  
**shRNA<sup>mir</sup>:** híbrido entre un *short-harpin* RNA y parte del microRNA-30 (miR-30)  
**Tbx2:** factor de transcripción Tbox de tipo 2  
**TERT:** transcriptasa reversa de la telomerasa  
**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta  
**TGFB1:** factor de crecimiento transformante tipo beta inducido

**TMA:** *tissue microarray*  
**TSP-1:** trombospondina 1  
**TTS-2.2:** proteína de secreción de transporte 2.2  
**TU/ml:** unidades de transducción/ml  
**TYR:** tirosinasa  
**UPR:** *unfolded protein response*  
**UTR:** regiones no traducidas  
**UV:** ultravioleta  
**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular  
**VGP:** melanoma en fase de crecimiento vertical  
**VHL:** proteína von Hippel-Lindau  
**VM:** *vasculogenic mimicry*



## **INTRODUCCIÓN**



## 1. FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTARIO

El factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) es una glicoproteína de secreción de 50 kDa que fue inicialmente aislada del medio condicionado de células en cultivo del epitelio pigmentario de la retina (RPE) fetal humana (Tombran-Tink and Johnson, 1989). Aunque inicialmente fue identificado como un factor neurotrópico, estudios posteriores demostraron que PEDF presenta una expresión más generalizada, estando presente tanto en tejidos fetales como adultos (Ek *et al.*, 2006). También se le conoce como EPC-1 (*early population doubling cDNA-1*), ya que se ha observado la pérdida de su expresión en las sucesivas divisiones celulares en cultivos primarios de fibroblastos (Pignolo *et al.*, 1993).

El gen humano de *PEDF* (*SERPINF1*) tiene un tamaño de 16 kb y está dividido en 8 exones y 7 intrones (Tombran-Tink *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2006). Se encuentra localizado en el cromosoma humano 17p13.1 y presenta una alta conservación en vertebrados superiores (Tombran-Tink, 2005).

PEDF pertenece a la familia de los inhibidores de las serin-proteasas (serpinas) que participan en el control de diversos procesos biológicos como la coagulación, activación del complemento y remodelación de la matriz extracelular (Filleur *et al.*, 2009; Tombran-Tink, 2005). Sin embargo PEDF, junto con otros miembros de la familia, carece de actividad inhibidora debido a modificaciones en el dominio llamado lazo del centro reactivo (RCL, *reactive centre loop*) donde reside dicha actividad (Becerra *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1990; Simonovic *et al.*, 2001; Steele *et al.*, 1993).

Aunque comparte una considerable homología con otros miembros de la familia de las serpinas (Steele *et al.*, 1993), se han identificado unas regiones muy conservadas en los extremos N-terminal (N-ter) y C-terminal (C-ter), concretamente los residuos 40-67 en N-ter y 277-301 en C-ter, que se encuentran únicamente en PEDF, lo que sugiere la implicación en funciones específicas de esta serpina sin capacidad inhibidora (Tombran-Tink, 2005; Xu *et al.*, 2006). Asimismo, también se ha identificado una secuencia putativa de localización nuclear (residuos 141-151) que está altamente conservada en PEDF entre las diferentes especies y que podría ser la responsable de la localización nuclear observada en células RPE (Tombran-Tink, 2005). Por último, también se ha descrito la existencia de un dominio de unión a colágeno y otro de unión a heparina, así como un dominio de unión a receptores putativos (Meyer *et al.*, 2002; Simonovic *et al.*, 2001; Tombran-Tink, 2005).

En los últimos años, son muchos los estudios que han puesto de manifiesto el carácter multifuncional de PEDF, tanto en células normales como en un contexto tumoral, describiendo no sólo su actividad neurotrófica y neurodiferenciadora, sino también su potente actividad anti-angiogénica (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009).

### 1.1. Efectos funcionales de PEDF

PEDF fue inicialmente caracterizado como un factor neurodiferenciador en células de retinoblastoma Y79 (Tombran-Tink *et al.*, 1991) aunque posteriormente se comprobó su capacidad para inducir diferenciación, supervivencia y protección de muerte celular en muchos tipos celulares del sistema nervioso. PEDF previene la degeneración de las neuronas de la retina que están expuestas a isquemias transitorias (Ogata *et al.*, 2001), y también protege a otras regiones del cerebro y de la médula espinal del daño causado debido al estrés oxidativo y toxicidad por glutamato (Bilak *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1999; DeCoster *et al.*, 1999; Taniwaki *et al.*, 1995). Se ha descrito la implicación del factor nuclear kappa-B (NF-kB) en todos estos procesos como principal activador de la expresión de factores neurotróficos y anti-apoptóticos que participan en el control de la supervivencia, diferenciación y muerte celular entre los que se encuentra PEDF (Barnstable and Tombran-Tink, 2004; Yabe *et al.*, 2004).

En estudios recientes se ha descrito también que células endoteliales y ependimarias de la región subventricular del cerebro murino presentan secreción de PEDF, el cual podría estar promoviendo la auto-renovación de células madre neurales adultas que carecen de la expresión de este factor (Andreu-Agullo *et al.*, 2009; Ramirez-Castillejo *et al.*, 2006). En estas células madre, PEDF no actúa como un factor mitogénico, sino que sirve como una señal de activación que aumenta la probabilidad de que las células madre se auto-renueven en presencia de otros factores de crecimiento (Pumiglia and Temple, 2006).

Además de estos efectos funcionales, en 1999 el grupo de N. Bouck identificó a PEDF como un potente inhibidor endógeno de la angiogénesis (Dawson *et al.*, 1999), describiendo su importante papel en el correcto mantenimiento de la vascularización de los diferentes compartimentos del ojo (Bouck, 2002). La pérdida de expresión de PEDF supone un crecimiento excesivo y aberrante de la vasculatura que está asociado no sólo con numerosas patologías oculares (Tombran-Tink, 2010), sino que debido a la expresión ubicua de este factor en el organismo, también conlleva problemas vasculares en el riñón, el páncreas y la próstata (Doll *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción anti-angiogénica de PEDF es el resultado de la combinación de tres procesos: (i) la inhibición de migración y proliferación de las células endoteliales (Dawson *et al.*, 1999; Fernandez-Garcia *et al.*, 2007), (ii) la inducción de muerte por apoptosis en estas células (Stellmach *et al.*, 2001) y (iii) la alteración del balance angiogénico mediante la disminución de factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos tipo básico (bFGF); así como la activación de factores anti-angiogénicos como angiopoyetina-2 (Ang-2) y trombospondina-1 (TSP-1) (Bouck, 2002; Fernandez-Garcia *et al.*, 2007).

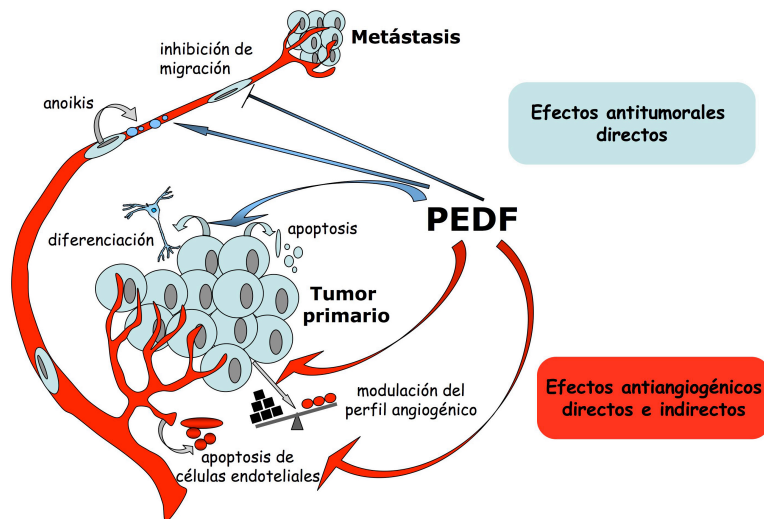
La activación de apoptosis sobre el endotelio es un proceso selectivo que únicamente afecta a vasos en proceso de remodelación (Bouck, 2002) debido a que PEDF induce la expresión del ligando de Fas (FasL) que se une específicamente a aquellas células endoteliales donde se ha iniciado la expresión del receptor de muerte Fas por la acción de factores pro-angiogénicos como el VEGF. De tal forma que la unión del ligando con su receptor desencadena la cascada apoptótica (Volpert *et al.*, 2002).

Con el objetivo de entender el mecanismo de acción de PEDF, en los últimos años se han ido identificando los dominios responsables de cada una de las funciones biológicas de este factor. De tal forma que se han encontrado dos epítomos conservados en el extremo N-terminal de PEDF: el péptido 34-mer, que comprende los residuos 24-57 y es responsable de las funciones anti-angiogénicas y pro-apoptóticas de PEDF; y el péptido 44-mer que abarca los residuos 58-101 y que reproduce los efectos neurotróficos y diferenciadores de PEDF en varios tipos celulares (Filleur *et al.*, 2005). Adicionalmente se han identificado regiones más pequeñas pero altamente conservadas, como el epítipo TGA, que se encuentra al inicio del péptido 34-mer y ejerce sus mismas funciones anti-angiogénicas; y el epítipo ERT, que a pesar de localizarse dentro del péptido 44-mer con características neurotróficas, presenta una actividad anti-angiogénica en adenocarcinoma de próstata (Filleur *et al.*, 2005) (ver apartado 1.4.). Adicionalmente, también se han delimitado regiones más pequeñas (P14, P18 y P23) dentro del péptido 34-mer que poseen actividad anti-angiogénica *in vitro* e *in vivo* (Mirochnik *et al.*, 2009).

## 1.2. PEDF y cáncer

El descubrimiento de la potente actividad anti-angiogénica de PEDF supuso el inicio de la posible aplicación terapéutica de este factor no sólo en patologías oculares, donde inicialmente se descubrió su potencial, sino también en otras lesiones donde tiene lugar una neovascularización excesiva y aberrante, como el cáncer. Son varios los estudios que describen la potente actividad anti-tumoral de PEDF en diversos tipos de cáncer, y concretamente nuestro laboratorio junto con otros grupos, ha contribuido a dilucidar aspectos fundamentales del mecanismo de acción anti-tumoral de PEDF en el contexto del melanoma (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007).

La acción anti-tumoral de PEDF es el resultado de la suma de efectos sobre las células endoteliales (efectos anti-tumorales indirectos) y las propias células del tumor (efectos anti-tumorales directos) (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009) (Figura 1).



**Figura 1. Mecanismo de acción anti-tumoral de PEDF.** La potente actividad anti-tumoral de PEDF se basa en una acción dual sobre las células tumorales y las células endoteliales. Las propiedades anti-angiogénicas son consecuencia de la inducción de apoptosis en las células endoteliales activadas (efecto anti-angiogénico directo) y la modulación de la producción de factores angiogénicos por las células tumorales (efecto anti-angiogénico indirecto). Los efectos anti-tumorales directos incluyen la inducción de diferenciación, inhibición de migración e inducción de apoptosis en las células tumorales. La inhibición

del potencial metastásico está basado en la inhibición de la angiogénesis y en la inhibición directa de las capacidades migratorias e invasivas de las células tumorales, así como en la inducción de *anoikis* en las células tumorales en tránsito hacia nuevos focos metastásicos (Adaptado de (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007)).

### 1.2.1. Efectos anti-tumorales indirectos

Debido a su gran capacidad anti-angiogénica, PEDF contribuye a restringir la neovascularización no sólo en tejidos normales sino también en situaciones aberrantes, como la progresión tumoral, donde PEDF reduce la capacidad de vascularización del tumor evitando así su crecimiento y dificultando la diseminación por el organismo de las células tumorales. El papel anti-angiogénico de PEDF ha sido descrito en gran variedad de tumores sólidos como neuroblastoma (Crawford 2001), glioblastoma (Guan *et al.*, 2003), tumores de Wilms (Abramson *et al.*, 2003), cáncer de próstata (Doll *et al.*, 2003) y melanoma (Abe *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004).

El este sentido, el efecto anti-tumoral de PEDF es debido a una acción directa sobre las células endoteliales de los vasos en remodelación mediante la activación de la vía Fas/FasL promoviendo su muerte por apoptosis (Garcia *et al.*, 2004; Stellmach *et al.*, 2001; Volpert *et al.*, 2002). A este mecanismo se suma el efecto inhibitorio de PEDF sobre c-FLIP (proteína inhibitoria similar a FLICE), un dominante negativo endógeno de la proteína pro-apoptótica caspasa 8 (Zaichuk *et al.*, 2004). Asimismo, PEDF inhibe la proliferación (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007) y migración (Dawson *et al.*, 1999) de las células endoteliales.

Además del efecto anti-angiogénico directo sobre las propias células del endotelio, PEDF ejerce una acción anti-angiogénica indirecta modulando el balance angiogénico de las propias células tumorales, donde se encuentra favorecida la expresión de factores pro-angiogénicos para promover la vascularización del tumor. PEDF normaliza este balance mediante la regulación de diversos factores: disminuye la expresión de factores angiogénicos como VEGF (Abe *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004), bFGF (Garcia *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2003), interleuquina 8 (IL8) (Orgaz *et al.*, 2011) y el factor de crecimiento transformante tipo beta-inducido (TGFBI) (Orgaz *et al.*, 2011), además de

metaloproteinasas de matriz (MMP) relevantes para la angiogénesis como las metaloproteinasas de tipo 2 (MMP-2) y tipo 9 (MMP-9) (Filleur *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2003); y aumenta la expresión de factores anti-angiogénicos como Ang-2 (Garcia *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2003) y TSP-1 (Guan *et al.*, 2003).

Como consecuencia de esta normalización del balance angiogénico, PEDF promueve una reducción de la vascularización que conlleva el colapso del tumor debido a la disminución de la tasa proliferativa de sus células y a la aparición de regiones necróticas en áreas hipóxicas por la falta de aporte de oxígeno y nutrientes a las células (Garcia *et al.*, 2004).

### 1.2.2. Efectos anti-tumorales directos

En tumores de origen neuronal, PEDF promueve la diferenciación de estas células, lo que explicaría la reducción de su fenotipo maligno en retinoblastoma (Tombran-Tink *et al.*, 1991) y neuroblastoma (Crawford *et al.*, 2001). Asimismo, se ha descrito también la capacidad de PEDF para inducir diferenciación neuroendocrina en células de tumores pancreáticos (Filleur *et al.*, 2005), sugiriendo que la actividad pro-diferenciadora de PEDF no está específicamente ligada al linaje neuronal. Se ha demostrado la implicación de NF- $\kappa$ B como mediador del efecto diferenciador de PEDF en células tumorales, aunque tampoco se descarta la participación de un receptor específico de 80 kDa que se expresa en células de origen neuronal (ver apartado 1.4.).

Por otro lado, varios estudios describen la capacidad de PEDF de inducir apoptosis no sólo en células endoteliales sino también en células tumorales de glioma (Guan *et al.*, 2003), osteosarcoma (Takenaka *et al.*, 2005) y melanoma (Abe *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009). PEDF sensibiliza a las células tumorales a la apoptosis de una forma indirecta, alterando la vascularización del tumor originando áreas hipóxicas que estresan a las células, y también de una forma directa a través de la vía Fas/FasL (Abe *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009), estimulando la expresión de las caspasas 3/7 implicadas en la cascada apoptótica (Takenaka *et al.*, 2005) y disminuyendo la expresión de inhibidores de esta vía (Orgaz *et al.*, 2011).

Por último, entre los efectos anti-tumorales directos de PEDF también se encuentra la inhibición de la migración e invasión en células de melanoma, glioma y otros (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007). En cáncer de colon se ha observado la unión de PEDF a colágeno tipo I y III, donde la sobre-expresión de este factor conlleva una disminución de la migración. Se ha sugerido que el efecto anti-migratorio en estas células podría ser debido a la competición de PEDF con las integrinas por la unión a los componentes de la matriz extracelular (Kozaki *et al.*, 1998). En un trabajo más reciente de nuestro laboratorio en colaboración con el grupo de O. Volpert demostramos que PEDF restringe la capacidad de las células de melanoma para adoptar un fenotipo ameboide necesario para invadir rápidamente, al mismo tiempo que reprime la actividad proteolítica de las células con morfología mesenquimal que migran lentamente, mediante la regulación del balance entre RhoA y Rac1 (Ladhani *et al.*, 2011).

Asimismo, la modulación que realiza PEDF en la producción de quimioatrayentes por parte de las células tumorales implica también una inhibición de la migración de estas células. La reducción de factores pro-angiogénicos como VEGF y bFGF, junto con la inducción de los factores anti-angiogénicos TSP-1 y Ang-2 supone un impedimento para la diseminación metastásica de células tumorales a otros nichos. En este sentido, PEDF también regula la expresión de genes que favorecen la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular (aumento de fibronectina y reducción de colágeno tipo IV COL4A2) e impiden su migración (Orgaz *et al.*, 2011). Por último, PEDF disminuye la supervivencia de células de melanoma cuando éstas se encuentran en suspensión sin unión al sustrato (inducción de *anoikis*), afectando drásticamente a la viabilidad de las células tumorales que se encuentran en tránsito hacia el órgano diana durante el proceso de metástasis (García *et al.*, 2004).

Todas estas observaciones apoyan el potencial terapéutico de PEDF en cáncer. Gracias a su naturaleza multifuncional, es capaz de actuar a varios niveles limitando no sólo el crecimiento del tumor sino también su diseminación a otros órganos diana.

### 1.3. PEDF y melanoma

Desde hace varios años, nuestro laboratorio (Fernández-García *et al.*, 2007; García *et al.*, 2004) junto con otros grupos (Abe *et al.*, 2004; Doll *et al.*, 2003; Ek *et al.*, 2006) ha descrito la potente actividad anti-metastásica de PEDF en el melanoma, basada en una acción dual tanto sobre las células del microentorno como en las propias células del tumor (Fernández-García *et al.*, 2007).

Dado que el melanoma cutáneo es una lesión maligna que se desarrolla a partir de los melanocitos, en un trabajo reciente del laboratorio nos preguntamos si este tipo celular expresaba PEDF de manera endógena. El análisis de expresión de PEDF en los diferentes tipos celulares que componen la piel reveló que los melanocitos secretaban altos niveles de PEDF, comparables con los detectados en otros tipos celulares (Orgaz *et al.*, 2009). Los fibroblastos, de acuerdo con trabajos previos, también expresaban altos niveles de PEDF (Orgaz *et al.*, 2009). En este tipo celular se ha visto que PEDF está implicado en el control de su estado proliferativo (Francis *et al.*, 2004; Tresini *et al.*, 1999) y además podría estar ejerciendo también un papel en el mantenimiento de la correcta vascularización de la piel. Por el contrario los queratinocitos, aún siendo el tipo celular más abundante en la epidermis, no expresaban PEDF (Orgaz *et al.*, 2009).

En los melanocitos, el silenciamiento de PEDF mediante estrategias de interferencia con lentivirus supuso un incremento en su migración e invasión, así como un aumento moderado en su tasa de crecimiento (Orgaz *et al.*, 2009). Se ha planteado también que al igual que en los fibroblastos, los melanocitos podrían estar participando a través de PEDF de la correcta vascularización de la piel. Estudios recientes muestran evidencias de la implicación de PEDF en funciones propias del linaje melanocítico, como la transferencia de melanina mediante vesículas especializadas (melanosomas) a los queratinocitos. La sobre-expresión de PEDF en células de melanoma regula la expresión de



Rab27a y melanofilina, dos proteínas implicadas en el transporte de los melanosomas y transferencia de melanina (Orgaz *et al.*, 2011). En este sentido, también se ha propuesto la participación de PEDF en la producción de pigmento por su presencia en melanosomas inmaduros de células de melanoma (Chi *et al.*, 2006), la inducción de la expresión de tirosinasa (TYR) (Abul-Hassan *et al.*, 2000) y la maduración de melanosomas en células RPE (Malchiodi-Albedi *et al.*, 1998).

La alta expresión de PEDF en melanocitos junto con el descubrimiento de los efectos anti-tumorales de PEDF en el melanoma dejaba abierta la posibilidad de que su expresión pudiera estar siendo modulada negativamente durante la adquisición del fenotipo maligno.

El análisis de la expresión de PEDF en lesiones clasificadas de acuerdo a criterios histopatológicos mostró una gran variabilidad de expresión de PEDF, pero con una clara tendencia a su pérdida en metástasis (Orgaz *et al.*, 2009). Además, al clasificar un gran número de líneas de melanoma según su huella de expresión génica en perfiles proliferativo ó invasivo, observamos un descenso significativo de la expresión de PEDF en las lesiones más invasivas, sugiriendo una correlación inversa entre agresividad del melanoma y expresión de PEDF (Orgaz *et al.*, 2009). Observamos además que la expresión de este factor estaba sujeta a cierta plasticidad y que podía ser reprogramado durante la progresión metastásica del melanoma. Utilizamos una pareja de líneas de melanoma, aisladas de la misma metástasis cutánea de un paciente, que presentaban fenotipos opuestos de agresividad (poco agresivo y muy agresivo) (Seftor *et al.*, 2005). Observamos que únicamente la línea con características poco agresivas mostraba niveles endógenos de PEDF similares a los detectados en los melanocitos, mientras que eran indetectables en la línea más agresiva (Orgaz *et al.*, 2009).

La relación observada entre pérdida de PEDF y aumento de agresividad del melanoma implica que las funciones biológicas de PEDF en la célula del melanoma deben ser incompatibles con la adquisición de un fenotipo metastásico, promoviendo así su inhibición. Al igual que en melanocitos, el silenciamiento de PEDF en líneas de melanoma poco agresivas supuso un aumento de su capacidad invasiva y migratoria (Orgaz *et al.*, 2009). Observamos también que PEDF inhibe la formación de metástasis espontáneas en pulmón a partir de un tumor primario y la formación de redes vasculogénicas por parte de las células de melanoma (*vasculogenic mimicry* (VM)) (Orgaz *et al.*, 2009). De la misma forma PEDF, a través del receptor de 80 kDa (ver apartado 1.4.), disminuye la capacidad metastásica de las células de melanoma inhibiendo la actividad de RhoA y activando a Rac1. Esta regulación reprime la adquisición de un fenotipo ameboide y de la actividad proteolítica de las células, características indispensables para su extravasación y formación de metástasis (Ladhani *et al.*, 2011).

Con todos estos datos, nuestro laboratorio propuso un modelo donde la reprogramación de la expresión de PEDF es un proceso importante para la alternancia del fenotipo proliferativo al invasivo que promueve la progresión metastásica del melanoma. Mecanismos que aún no conocemos mantendrían altos los niveles de expresión en las células del tumor primario con perfil proliferativo,

inhibiendo su capacidad invasiva y migratoria, así como su potencial angiogénico y su capacidad de VM. Sin embargo, la pérdida de PEDF ayudaría a las células de melanoma a adquirir un fenotipo invasivo esencial para su diseminación y colonización de órganos distantes. Señales del microentorno podrían volver a reprogramar la expresión de PEDF en metástasis, adquiriendo de nuevo características proliferativas con altos niveles de PEDF y originando así lesiones con una expresión heterogénea de PEDF (Orgaz *et al.*, 2009).

### 1.4. Receptores de PEDF

La diversidad de funciones de PEDF en diferentes tipos celulares hace necesaria la existencia de diferentes receptores que medien sus múltiples respuestas en cada tipo celular. Diversos estudios han caracterizado la afinidad de PEDF por la superficie de células de retinoblastoma, neuronas del cerebelo granular (Alberdi *et al.*, 1999), de la retina (Aymerich *et al.*, 2001), motoneuronas (Bilak *et al.*, 1999), células de próstata (Filleur *et al.*, 2005) y células endoteliales (Yamagishi *et al.*, 2004). Además, PEDF puede ser retenido en la matriz extracelular debido a interacciones iónicas con glucosaminglucanos sulfatados (heparina y otros) (Alberdi *et al.*, 1998) y no sulfatados (hialuronano) (Becerra *et al.*, 2008) además de colágeno tipo I (Meyer *et al.*, 2002).

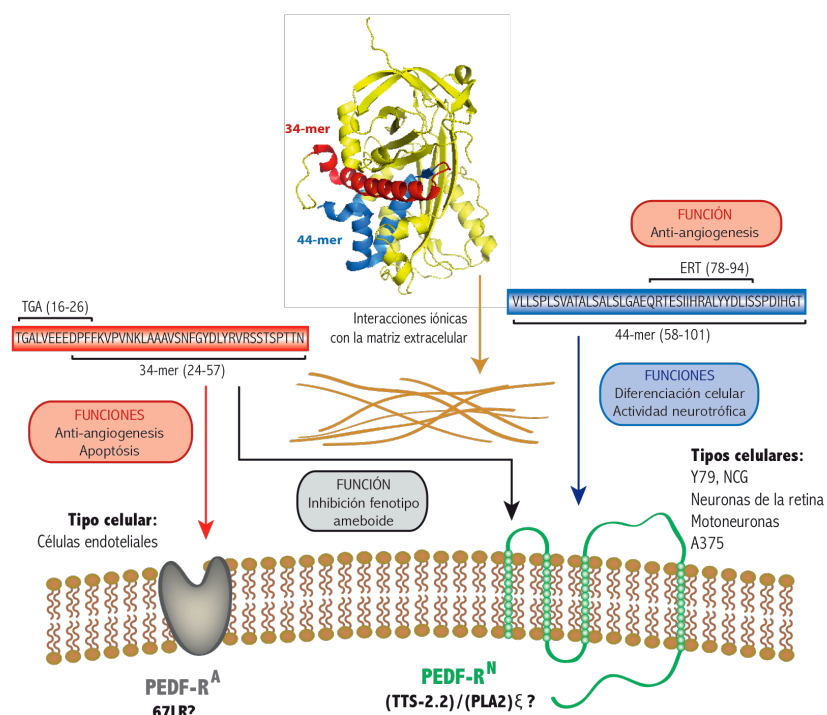
Mediante el uso de los péptidos sintéticos 34-mer y 44-mer ha sido posible determinar la existencia de al menos dos receptores putativos para PEDF. Estos epítomos son capaces de unirse a la superficie de las células endoteliales y de próstata, pero no compiten por su unión al receptor (Filleur *et al.*, 2005), lo que sugiere la existencia de dos receptores con funciones diferentes: PEDF-R<sup>N</sup>, que interacciona con el epítipo 44-mer regulando las funciones neurotróficas y neuroprotectoras de PEDF; y PEDF-R<sup>A</sup> que media los efectos anti-angiogénicos de PEDF por su unión con el péptido 34-mer. El receptor PEDF-R<sup>N</sup> de 80 kDa está presente en la superficie de células de retinoblastoma humano, neuronas de la retina, neuronas del cerebelo granular y motoneuronas; mientras que el receptor PEDF-R<sup>A</sup> de 60 kDa se localiza específicamente en células endoteliales (Filleur *et al.*, 2009) (Figura 2).

Por otro lado, se ha identificado en la superficie de la retina y de las células inmortalizadas de retinoblastoma (ARPE-19) un receptor para PEDF con actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (Notari *et al.*, 2006). Este receptor, también conocido como proteína de secreción de transporte 2-2 (TTS-2.2)/fosfolipasa A<sub>2</sub> independiente (PLA<sub>2</sub>)<sub>ξ</sub>; desnutrina de ratón ó triglicerido lipasa adiposa (ATGL) presenta un tamaño de 80 kDa aunque no se ha demostrado que se trate del receptor PEDF-R<sup>N</sup> descrito previamente. La actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> libera ácidos grasos que funcionan como segundos mensajeros dentro de la célula, por lo que se ha propuesto que dependiendo del lípido liberado por su acción, este receptor podría activar diferentes vías de transducción (Filleur *et al.*, 2009).

Recientemente se ha descrito la unión de PEDF al receptor de laminina de 67 kDa (67LR) (Bernard *et al.*, 2009), que podría ser el receptor PEDF-R<sup>A</sup> de 60 kDa identificado anteriormente en células endoteliales, debido a que la unión del péptido 34-mer a este receptor muestra los mismos

efectos anti-angiogénicos caracterizados para la unión con el receptor de 60 kDa (Yamagishi *et al.*, 2004).

Por último, en un trabajo reciente en células de melanoma, se ha descrito que la acción anti-metastásica de PEDF reside en el péptido 34-mer, el cual impide la adquisición del fenotipo ameboide por parte de las células de melanoma (Ladhani *et al.*, 2011). Aunque los datos de los que se disponía hasta el momento parecían indicar que existía una especificidad de unión de cada péptido con su receptor (unión del 34-mer con PEDF-R<sup>A</sup> y del 44-mer con PEDF-R<sup>N</sup>), en el trabajo del grupo de O. Volpert se describe que el péptido 34-mer ejerce la función anti-metastásica a través de su unión con el receptor PEDF-R<sup>N</sup> en células de melanoma (Ladhani *et al.*, 2011).



**Figura 2. Estructura tridimensional de PEDF y funciones de los péptidos derivados de PEDF y sus receptores.** Estructura cristalográfica de la molécula de PEDF mostrando la localización de los péptidos 34-mer y 44-mer. PEDF puede unirse a la matriz extracelular mediante interacciones iónicas con el colágeno tipo I y glucosaminoglucanos. Los péptidos 34-mer, TGA y ERT presentan actividad anti-angiogénica a través de su unión con el receptor 60 kDa (PEDF-R<sup>A</sup>, propuesto como el receptor de laminina de 67 kDa) en células endoteliales. El péptido 34-mer induce también la apoptosis en células tumorales a través del receptor PEDF-R<sup>A</sup> y además ejerce funciones anti-metastásicas en células de melanoma A375 por su unión con el receptor TTS-2.2 / (PLA2)ξ (identificado como PEDF-R<sup>N</sup>). Los péptidos 44-mer y ERT presentan acciones neurotróficas a través de su unión con el receptor PEDF-R<sup>N</sup>. Abreviaturas: 67LR: Receptor de laminina 67 kDa; TTS-2.2/(PLA2): proteína de secreción de transporte 2.2/ fosfolipasa A2 independiente; Y79: células de retinoblastoma; NCG: neuronas del cerebelo granular; A375: células de melanoma (Adaptado de (Fernández-Barral, *et al.*, 2011)).

## 2. MELANOMA

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que, aunque constituye sólo el 10% de los cánceres de tipo dermatológico, es responsable del 80% de las muertes por cáncer de piel (Postovit *et al.*, 2006). El

diagnóstico precoz permite en el 80% de los casos la curación mediante resección quirúrgica (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Sin embargo el tratamiento se complica con la progresión de la enfermedad debido a la resistencia del melanoma avanzado a las terapias existentes; lo que conlleva una mala prognosis, con una tasa media de supervivencia de 6 meses a 5 años para el 5% de los pacientes que presentan lesiones metastásicas (Cummins *et al.*, 2006; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Estas características convierten al melanoma en uno de los cánceres más agresivos y letales; lo que hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias más eficaces para su diagnóstico y tratamiento (Soengas and Lowe, 2003).

Las células normales a partir de las cuales se origina el melanoma son los melanocitos, que se encuentran predominantemente en piel y ojos donde producen melanina, el pigmento responsable del color de la piel, de los ojos y del pelo (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Los melanocitos cutáneos se originan a partir de precursores de la cresta neural que gracias a su gran movilidad, migran a la piel durante el desarrollo embrionario, asentándose finalmente en la capa basal de la epidermis y en los folículos pilosos (Chin, 2003; Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Lin and Fisher, 2007). Dentro de la piel, los melanocitos se encuentran dispersos entre los queratinocitos, formando una unidad melano-epidérmica donde se establece una relación simbiótica entre un melanocito y alrededor de 36 queratinocitos (Fitzpatrick and Breathnach, 1963; Haass *et al.*, 2005). A través de sus dendritas, los melanocitos transfieren a los queratinocitos de su unidad los melanosomas que contienen los pigmentos de melanina necesarios para la protección asociada a la radiación UV. Por su parte, los queratinocitos secretan factores a través de los cuales regulan no sólo la transferencia de melanina, sino también su producción y la proliferación de los melanocitos (Chin, 2003; Hsu *et al.*, 2002; Postovit *et al.*, 2008).

## 2.1. Criterios de clasificación del melanoma cutáneo

### 2.1.1. Clasificación histopatológica

La observación clínica e histopatológica del melanoma cutáneo ha permitido realizar una clasificación de la evolución del melanoma de acuerdo a su localización y etapa de la progresión, de tal forma que podemos distinguir las siguientes fases: *naevus*, melanoma primario en fase de crecimiento radial (RGP, *radial growth phase*), melanoma primario en fase de crecimiento vertical (VGP, *vertical growth phase*) y metástasis de melanoma (Clark, 1991).

Durante la progresión del melanoma se produce una alteración de la unidad melano-epidérmica. Mutaciones en vías críticas de control de proliferación, así como la producción de factores autocrinos y la pérdida de adhesión, favorece en los melanocitos el escape de la estrecha regulación a la que están sometidos por los queratinocitos (Haass *et al.*, 2005). De esta forma, los melanocitos proliferan de manera incontrolada dando lugar a que el ratio melanocito/queratinocito aumente, lo que conlleva la

formación de un *naevus* (Postovit *et al.*, 2008). Estos *naevi* son lesiones benignas que raramente progresan a melanoma, permaneciendo durmientes durante décadas debido a la inducción de senescencia por alteraciones oncogénicas (Bennett, 2003; Michaloglou *et al.*, 2005; Miller and Mihm, 2006). Sin embargo, el *naevus* benigno puede progresar a un *naevus* displásico, caracterizado por la asimetría estructural y atipia citológica de los melanocitos, que llevan a considerarlo como un posible precursor del melanoma cutáneo (Kraemer and Greene, 1985; Miller and Mihm, 2006).

El melanoma en fase de crecimiento radial (RGP) es considerado como el primer estadio distinguible de malignización del melanoma (Hsu *et al.*, 2002). Los melanocitos, que todavía dependen de factores de crecimiento suministrados por los queratinocitos (Chin, 2003), se encuentran confinados en la epidermis donde crecen lateralmente, aunque pueden mostrar una invasión localizada de la dermis individualmente o en grupos; sin embargo presentan una capacidad invasiva y metastásica muy limitada (Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Miller and Mihm, 2006).

Los melanomas RGP pueden progresar a melanomas en fase de crecimiento vertical (VGP) donde las células se desplazan verticalmente atravesando la membrana basal, invadiendo la dermis y el tejido subcutáneo, formando grandes nódulos de células malignas (Chin, 2003; Postovit *et al.*, 2008). Es considerado el estadio más peligroso de la progresión del melanoma. Los melanocitos muestran una regulación completamente independiente de los queratinocitos (Chin, 2003) y presentan un gran potencial metastásico debido a su capacidad para infiltrarse en el sistema circulatorio y linfático (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Debido a la adquisición de la potente invasividad y capacidad de originar metástasis en órganos distantes por parte del melanoma VGP, la transición entre los estadios RGP y VPG es considerado como el paso más crucial e importante en la progresión maligna del melanoma (Chin, 2003).

Aunque este modelo de clasificación histopatológica de la progresión maligna del melanoma se plantea como una transición lineal y ordenada por cada una de las fases, no todos los melanomas cumplen este orden. Melanomas RGP ó VGP pueden originarse directamente a partir de melanocitos aislados o *naevus*, y ambos pueden progresar directamente a metástasis de melanoma (Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Miller and Mihm, 2006).

Además de la clasificación basada en la fase de crecimiento y localización, también se tiene en cuenta en clínica la ulceración del tumor (necrosis con pérdida de epidermis por encima del tumor) y el espesor de la lesión (Espesor de Breslow), que establece grupos pronósticos siendo básicamente bueno en melanomas con Breslow menor de 1 mm y peor en mayores de 1,5 mm (Balch *et al.*, 2001).

### 2.1.2. Clasificación molecular. Modelo del *phenotype switching*

La clasificación histopatológica de los melanomas malignos, la más utilizada en diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, principalmente tiene en cuenta criterios como el grosor y fase de crecimiento de la lesión, así como en la presencia o ausencia de ulceración (Fecher *et al.*, 2007). Sin

embargo, no es extraño encontrar casos de melanomas que muestran un espesor poco significativo para considerarlo agresivo pero que metastatizan rápidamente, mientras que algunas lesiones con un grosor elevado no cursan con enfermedad metastásica (Lomuto *et al.*, 2004; Slingluff *et al.*, 1988).

El melanoma se caracteriza por ser una lesión muy heterogénea donde se pueden encontrar células de morfología variable (Levene, 1980) y donde los marcadores específicos del linaje melanocítico no están presentes en todas las células que forman la lesión (Banerjee and Harris, 2000). Esta fuente de heterogeneidad es debida no sólo a las transformaciones oncogénicas que sufre la célula del melanoma, sino también a la respuesta de las células tumorales al microentorno desestructurado que compone la lesión, así como a la alteración de las redes de regulación entre las propias células (Hoek *et al.*, 2008; Marusyk *et al.*, 2012).

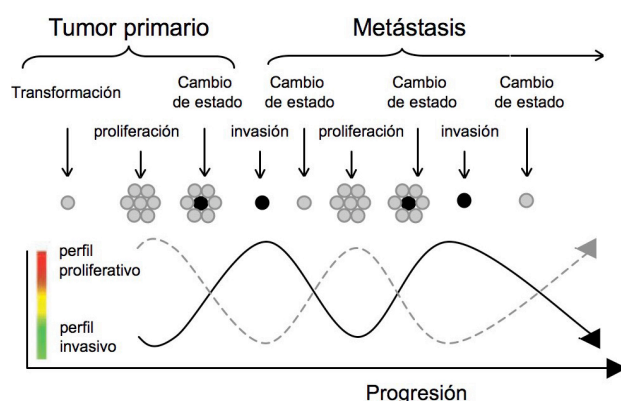
Estas características dificultan el correcto diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, por lo que han ido surgiendo nuevos modelos de clasificación del melanoma basados en criterios moleculares en vez de histopatológicos, que permiten una descripción más precisa de las características tumorales del melanoma.

En estos estudios, mediante el uso de *microarrays* de cDNA, clasifican a las líneas celulares y biopsias de melanoma en grupos atendiendo al grado de agresividad y potencial metastásico (Bittner *et al.*, 2000; Haqq *et al.*, 2005; Hoek, 2007). No sólo confirman la gran heterogeneidad del melanoma sino que también describen la importancia del microentorno tumoral en la determinación de los programas de expresión génica de las células de melanoma y en la progresión a metástasis. En este sentido, los trabajos realizados por el grupo de M. Hendrix y colaboradores ponen de manifiesto la gran plasticidad del melanoma así como su capacidad para ser reprogramado dependiendo del microentorno que le rodee (Hendrix *et al.*, 2003; Postovit *et al.*, 2006). Las células de melanoma muy agresivas manifiestan una plasticidad funcional caracterizada por la expresión simultánea de genes pertenecientes a diferentes tipos celulares (cadherinas del endotelio vascular y queratinas específicas de células epiteliales) y por la reducción de expresión de genes específicos del linaje melanocítico (tirosinasa y melan-a) (Postovit *et al.*, 2008). De la misma forma, estas células de melanoma son capaces de adquirir un fenotipo “vascular”, formando estructuras tubulares que simulan los vasos sanguíneos (Seftor *et al.*, 2002). Además, el grupo de M. Hendrix también ha descrito la capacidad de reprogramación de las células de melanoma y la importancia del microentorno utilizando modelos de recreación de microambientes específicos donde se observan reprogramaciones en los fenotipos de las células de melanoma y de cultivos primarios de melanocitos (Hendrix *et al.*, 2007; Postovit *et al.*, 2006; Seftor *et al.*, 2002).

El modelo propuesto por los grupos de K. Hoek (Hoek *et al.*, 2006; 2008) y C. Goding (Carreira *et al.*, 2006) mediante análisis de expresión génica y ensayos funcionales, pretende explicar la heterogeneidad del melanoma así como la plasticidad y capacidad metastásica de sus células. El resultado es la identificación de dos firmas de expresión molecular que permite agrupar a las células de melanoma en dos grupos principales: un cohorte con alta capacidad proliferativa y bajo potencial

invasivo (perfil proliferativo); y otro cohorte poco proliferativo pero altamente invasivo (perfil invasivo).

Este modelo, denominado *phenotype switching* (Figura 3), propone una alternancia entre ambos fenotipos (proliferativo e invasivo) durante la progresión maligna del melanoma. La expresión de estos programas en las células de melanoma es excluyente, y por ello el proceso de metástasis requiere necesariamente que la célula de melanoma cambie de un programa a otro en función de la etapa del desarrollo metastásico en la que se encuentre (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2008). De esta forma, el desarrollo de la metástasis y su fenotipo heterogéneo estaría condicionado a la expresión de estos programas excluyentes regulados por el microambiente tumoral (Carreira *et al.*, 2006; Hoek *et al.*, 2008), en vez de ser debido a una acumulación de eventos genéticos (como establece el modelo clonal de progresión lial del melanoma (Miller and Mihm, 2006)). En lesiones primarias, observaríamos un mayor número de células con fenotipo proliferativo, sin embargo, la reprogramación a un fenotipo invasivo de algunas células del tumor permitiría la invasión local y posterior diseminación a órganos distantes, donde volvería a reprogramarse hacia un perfil proliferativo y desarrollar una micrometástasis (Figura 3).



**Figura 3. Modelo del *phenotype switching*.** La lesión primaria del melanoma está formada por células de perfil proliferativo. Una señal iniciadora desconocida procedente de una alteración de las condiciones del microentorno produce un cambio que da lugar a células de perfil invasivo, que escapan de la lesión primaria y, tras colonizar un sitio distal apropiado, vuelven a su estado proliferativo y forman una nueva metástasis, repitiéndose el ciclo de nuevo. Cada cambio en el fenotipo, o cambio de estado, se ve acompañado de un cambio en el grupo de genes expresados del perfil proliferativo al invasivo, y viceversa (Adaptado de (Hoek *et al.*, 2008)).

## 2.2. Moléculas, vías de señalización y señales del microentorno implicadas en el desarrollo del melanoma

La formación de un melanoma requiere una transformación maligna de los melanocitos, para lo que contribuyen no sólo factores de riesgo genéticos, como la pigmentación de la piel y el número de *naevi* benignos, sino también medioambientales como la exposición a la radiación UV (Chin, 2003).

A continuación se describen vías de señalización y moléculas, así como factores del microentorno implicadas en el desarrollo y progresión del melanoma cutáneo.

### 2.2.1. Genes implicados en el melanoma familiar

Presentar un historial familiar con antecedentes de melanoma supone uno de los principales riesgos para la aparición de un melanoma en un individuo. Se han identificado tres genes implicados en la aparición del melanoma familiar, que constituye alrededor del 8-12% de todos los casos de melanoma (Hayward, 2003): el gen inhibidor quinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*), el gen de quinasa dependiente de ciclina 4 (*CDK4*), ambos implicados en potentes vías de supresión tumoral; y por último el gen del receptor de la hormona estimuladora de melanocitos (*MC1R*) (Chin, 2003).

El gen *CDKN2A*, cuyas mutaciones han sido descritas en un 25-40% de los casos de melanoma familiar (Miller and Mihm, 2006), codifica las proteínas p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup>, que actúan como supresores tumorales participando en el control del ciclo celular, el crecimiento y la apoptosis regulando la vía del retinoblastoma (RB) y de p53 (Chin *et al.*, 2006). El gen *CDK4* es un importante regulador del ciclo celular, donde a través de su unión con la ciclina D1 favorece la transición de fase G1 a S (Polsky and Cordon-Cardo, 2003). Por último, el gen *MC1R* es un importante regulador de la producción de pigmento en los melanocitos (Lin and Fisher, 2007). *MC1R* presenta una gran variedad de polimorfismos en la población humana dando lugar a los diferentes fenotipos de piel (Sturm, 2002). En particular, los polimorfismos asociados con un fenotipo de cabello rojo, piel blanca con incapacidad para broncearse y con tendencia a lunares, presentan un mayor riesgo de aparición de melanoma debido a una disminución de la capacidad de la epidermis para responder a los daños celulares producidos por la radiación ultravioleta (UV) (Chin *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2002).

Además de estos genes, en los últimos años han surgido estudios que identifican nuevos genes implicados en la predisposición a sufrir un melanoma. Uno de ellos es el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), en el que se ha identificado la mutación E318K como un factor de riesgo en el desarrollo de melanoma tanto familiar como esporádico (Yokoyama *et al.*, 2011). Asimismo, la mutación en *PREX2*, regulador negativo de *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina), está presente en un 14% de los melanomas humanos y es capaz de acelerar la formación de tumores *in vivo* en melanocitos inmortalizados (Berger *et al.*, 2012).

### 2.2.2. Rutas MAPK y PI(3)K

La ruta RAS/RAF/MEK/ERK (proteína quinasa regulada extracelularmente) o MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno), activada por factores de crecimiento como el factor de células *stem* (SCF), bFGF y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), es una vía clave en la regulación de la proliferación en melanocitos y células de melanoma (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).



Se ha observado que un 90% de los melanomas humanos presenta hiperactividad de ERK (Cohen *et al.*, 2002). Este aumento en su actividad es debido principalmente a mutaciones en dos genes de la vía: *NRAS* (homólogo en neuroblastoma del oncogen viral RAS), donde la mutación más frecuente es la sustitución de glutamina por leucina en posición 61 (Q61L), con una incidencia del 15-30% en melanoma (Davies *et al.*, 2002); y sobre todo *BRAF* (homólogo B1 del oncogen viral del sarcoma murino v-raf) donde la sustitución de valina por ácido glutámico en la posición 600 (V600E) es la mutación más común presente en un 50-80% en melanomas (Davies *et al.*, 2002; Pollock *et al.*, 2003).  $BRAF^{V600E}$  promueve la activación constitutiva de ERK, estimulando la proliferación y supervivencia de las células de melanoma, así como la angiogénesis del tumor induciendo la secreción de VEGF (Sharma *et al.*, 2005).

Sin embargo, un dato que sorprende es la presencia de mutaciones de esta vía en *naevi* (lesiones melanocíticas senescentes que raramente evolucionan a un estado maligno (Bennett, 2003; Miller and Mihm, 2006)), donde  $NRAS^{Q61L}$  aparece en un 20% de los *naevi* benignos mientras que la incidencia de  $BRAF^{V600E}$  es del 80% (Pollock *et al.*, 2003). Dado que estas mutaciones en la vía de las MAPK promueven una proliferación anormal de las células, la inducción de senescencia (principalmente a través de p53 y del gen *CDKN2A* ( $p16^{INK4A}$  y  $p14^{ARF}$ )) supone un mecanismo de defensa por parte de las células para evitar su transformación oncogénica (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Son varios los grupos que han demostrado la entrada en senescencia de melanocitos primarios por sobre-expresión de  $BRAF^{V600E}$  (Denoyelle *et al.*, 2006; Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Michaloglou *et al.*, 2005; Scurr *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2008),  $NRAS^{Q61L}$  (Haferkamp *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2008) y *HRAS* (homólogo del oncogen viral del sarcoma de rata h-ras) con sustitución de glicina por valina en posición 12 ( $HRAS^{G12V}$ ) (Denoyelle *et al.*, 2006). Aunque esta entrada en senescencia sugiere la participación de  $p16^{INK4A}$ , se ha observado *in vitro* que *BRAF* y *NRAS* mutados pueden activar este proceso de forma  $p16^{INK4A}$  y p53 independiente (Haferkamp *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2008). Asimismo, se ha detectado *in vivo* que no todos los *naevi* con *BRAF* mutado presentan señal para  $p16^{INK4A}$  (Michaloglou *et al.*, 2005) y que ratones transgénicos para  $BRAF^{V600E}$  y nulos para  $p16^{INK4A}$  llegaban a desarrollar *naevi* además de melanomas (Dhomen *et al.*, 2009). Estos datos indican que la inducción de senescencia por oncogenes (OIS, *oncogen induced senescence*) de la vía MAPK no es un proceso estrictamente controlado por *CDKN2A* ni p53, en el que podrían estar participando otros procesos como la vía de estrés de retículo endoplasmático (ER) (Denoyelle *et al.*, 2006).

Aún así, la progresión maligna del melanoma requiere la salida del estado de senescencia por parte de las células del *naevus*, que podría ser debido a la cooperación con otras lesiones oncogénicas como la pérdida del locus *CDKN2A* (muy habitual en melanomas familiar) (Miller and Mihm, 2006), la amplificación de genes como *MYC* (Zhuang *et al.*, 2008) y *MITF* (Garraway *et al.*, 2005), mutaciones con pérdida de función en *PTEN* (Vredeveld *et al.*, 2012) ó mutaciones en la vía de p53 (Bennett, 2008) entre otros.

Otra vía de señalización importante en melanoma es la vía de la PI(3)K (fosfoinositol 3-OH-quinasa) implicada en supervivencia, proliferación y motilidad celular (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Se han encontrado mutaciones en *PI(3)K* en un 3% de los melanomas metastásicos (Omholt *et al.*, 2006), y mutaciones de pérdida de función de *PTEN* (supresor tumoral que actúa como inhibidor de PI(3)K) en un 5-20% de melanomas de estadio avanzado (Wu *et al.*, 2003). Asimismo, AKT se encuentra sobre-expresado en un 60% de los melanomas (Stahl *et al.*, 2004).

### 2.2.3. Factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF)

MITF es un factor de transcripción perteneciente a la familia bHLH (factores tipo básico hélice-lazo-hélice) que se une como un dímero al promotor de sus genes diana a través de las secuencias E-box GACGTG y CACATG (Yasumoto *et al.*, 1994). El gen de *MITF* presenta múltiples promotores que originan al menos 9 isoformas que difieren en sus dos primeros exones (Steingrimsen, 2008). La isoforma MITF-M, específica del linaje melanocítico, presenta una estricta regulación tanto a nivel de mRNA como de proteína (Levy *et al.*, 2006; Widlund and Fisher, 2003).

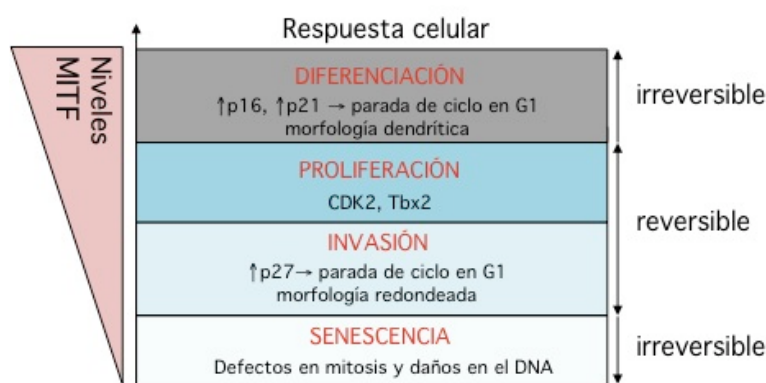
MITF es considerado como el regulador central en la biología del melanocito, ya que se ha descrito su implicación en la (i) determinación del linaje melanocítico, (ii) supervivencia de los melanoblastos (precursores de los melanocitos provenientes de la cresta neural), (iii) diferenciación y (iv) proliferación/supervivencia de los melanocitos (Cheli *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2006; Widlund and Fisher, 2003).

MITF, además de ser un factor clave en la regulación del melanocito, participa también en el desarrollo del melanoma; aunque sus acciones son complejas y no están totalmente dilucidadas. Por una parte, la expresión de altos niveles de MITF promueve la parada proliferativa a través del aumento de expresión de los inhibidores de ciclo celular p21<sup>CIP1</sup> y p16<sup>INK4A</sup> (Carreira *et al.*, 2006; Loercher *et al.*, 2005). Además, la sobre-expresión de MITF reduce la capacidad tumorogénica de las células de melanoma (Selzer *et al.*, 2002), así como su proliferación en presencia de BRAF oncogénico (BRAF<sup>V600E</sup>) en melanocitos y melanoma (Wellbrock and Marais, 2005). Sin embargo, son varios los estudios que consideran a MITF como un oncogen específico del linaje melanocítico (Garraway and Sellers, 2006). Se han encontrado amplificaciones del gen *MITF* en un 10-20% de melanomas, con una mayor incidencia en metástasis donde se asocia la expresión de MITF con una tasa de supervivencia menor a 5 años y mayor resistencia a agentes quimioterapéuticos (Garraway *et al.*, 2005). Además se ha observado que MITF puede cooperar con BRAF<sup>V600E</sup> en la transformación del melanocito; para lo cual requiere de la expresión de la unidad catalítica de la telomerasa (TERT), que es un dominante negativo de p53 y activador de CDK4 (Garraway *et al.*, 2005). Asimismo, MITF también es capaz de regular la proliferación de las células de melanoma reduciendo los niveles de los inhibidores de ciclo celular p27<sup>KIP1</sup>, p21<sup>CIP1</sup> y p19<sup>INK4D</sup> (Bejar *et al.*, 2003; Carreira *et al.*, 2006; Carreira *et al.*, 2000) e induciendo la expresión de la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) (Du *et*

*al.*, 2004). Por último, la pérdida de expresión de MITF supone la regulación negativa de genes implicados en la reparación y replicación del DNA y mitosis, promoviendo la entrada en senescencia de las células de melanoma (Strub *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y para poder explicar las funciones pro- y anti-proliferativas de MITF en el melanocito y las células de melanoma, el grupo de C. Goding propuso un modelo de reostato donde encontramos cuatro posibles fenotipos de acuerdo a los niveles de expresión de MITF: (i) diferenciado, (ii) proliferativo, (iii) invasivo y (iv) senescente (Figura 4) (Carreira *et al.*, 2006; Goding, 2011; Hoek and Goding, 2010). Niveles muy altos de MITF promueven la parada proliferativa (a través de p16<sup>INK4A</sup> y p21<sup>CIP1</sup>) y la diferenciación celular por expresión de genes implicados en pigmentación (como TYR) (Levy *et al.*, 2006; Widlund and Fisher, 2003). Los niveles intermedios de MITF favorecen la proliferación celular, presumiblemente a través de CDK2 (Du *et al.*, 2004); sin embargo la baja expresión de MITF supone la parada proliferativa a través de p27<sup>KIP1</sup> (Carreira *et al.*, 2006) y la expresión de genes implicados en migración e invasión (fibronectina, osteonectina y SNAIL) (Cheli *et al.*, 2011b). Por último, la pérdida de expresión de MITF a largo plazo provoca daños a nivel del DNA y la entrada en senescencia de las células (Strub *et al.*, 2011) (Figura 4).

Las diferencias existentes en cuanto a la expresión de MITF y sus funciones en el linaje melanocítico pueden ser también debidas a las modificaciones post-traduccionales a las que es sometido MITF. Estas modificaciones en MITF pueden promover no sólo su estabilidad sino también la activación transcripcional de diferentes genes diana (Giuliano *et al.*, 2011; Hoek and Goding, 2010).



**Figura 4. Modelo del reostato de MITF.** La variabilidad en los niveles de expresión de MITF determina sus efectos funcionales en melanocitos y células de melanoma. Altos niveles de MITF promueven la parada celular a través de la inducción de p16<sup>INK4A</sup> y p21<sup>CIP1</sup> y la diferenciación por expresión de genes implicados en pigmentación. Niveles intermedios de MITF favorecen la proliferación celular mediada por CDK2 y Tbx2; mientras que un descenso de expresión

de MITF supone la parada proliferativa por medio de p27<sup>KIP1</sup> y un aumento de la capacidad invasiva. Por último, la ausencia de MITF está asociada a daño celular y entrada en senescencia (Adaptado de (Carreira *et al.*, 2006)).

#### 2.2.4. Hipoxia

La hipoxia juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer y su progresión. Históricamente se ha asociado la presencia de zonas hipóxicas dentro de un tumor, incluido el melanoma cutáneo, como un marcador de mal pronóstico para el paciente (Lartigau *et al.*, 1997).

Bajas concentraciones de oxígeno promueven no sólo un cambio metabólico en las células del tumor, aumentando el transporte de glucosa y la glucólisis anaerobia; sino que también inducen el reclutamiento de células endoteliales favoreciendo la neovascularización del tumor (Semenza, 2002). Son varios los estudios que describen además el papel de la hipoxia en la formación de metástasis a través de diferentes mecanismos de acción: (i) favorece la transición epitelio mesénquima (EMT) inhibiendo de forma directa o indirecta la expresión de E-cadherina a través de SNAIL, TWIST y SIP1 (Yang and Wu, 2008); (ii) promueve la degradación de la matriz extracelular por medio de MMP-2 (Krishnamachary *et al.*, 2003); (iii) induce la expresión de factores pro-angiogénicos como VEGF, IL8 y Ang-2 que vascularizan el tumor (Bar-Eli, 1999; Hirota and Semenza, 2006; Karashima *et al.*, 2003); y (iv) aumenta la resistencia a *anoikis* (Rohwer *et al.*, 2008). En resumen, la hipoxia promueve la adquisición de un fenotipo maligno, que además de favorecer la vascularización del tumor, también promueve la supervivencia de las células tumorales y aumenta su potencial metastásico (Pouyssegur *et al.*, 2006).

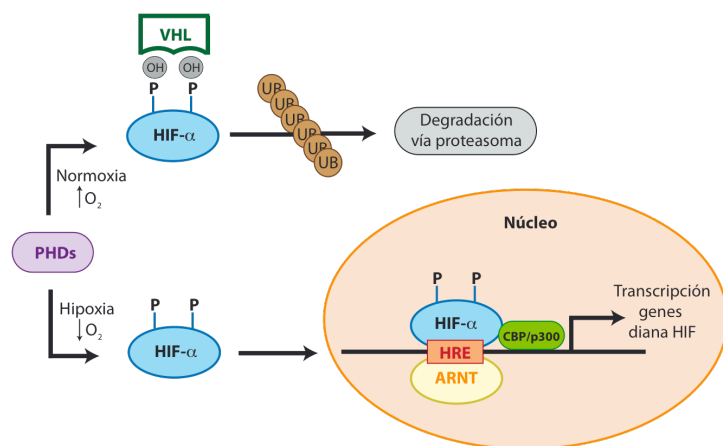
En los últimos años el grupo de B. Powell y colaboradores ha descrito la implicación de la hipoxia en la transformación maligna de los melanocitos (Bedogni *et al.*, 2005; 2008). En su estudio observan que mientras que la sobre-expresión de AKT presenta una débil actividad oncogénica en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>), en melanocitos inmortalizados de ratones nulos para *CDKN2A* AKT promueve un incremento significativo del número de células transformadas en presencia de bajas concentraciones de oxígeno (2% O<sub>2</sub>) (Bedogni *et al.*, 2005). Además, en un trabajo más reciente de este grupo se demuestra que la adquisición de un fenotipo transformante por sobre-expresión de AKT en condiciones de hipoxia es un proceso mediado por Notch1 (Bedogni *et al.*, 2008).

Los melanocitos residen en el estrato basal de la epidermis donde se encuentran a una concentración fisiológica de oxígeno en torno al 1-5% (Vaupel *et al.*, 1989). Se ha visto que esta hipoxia moderada favorece la proliferación celular y supervivencia evitando la entrada en senescencia (Alaluf *et al.*, 2000; Balin and Pratt, 2002; Minamino *et al.*, 2001; Studer *et al.*, 2000). Sin embargo, teniendo en cuenta los datos de los estudios del grupo de B. Powell, estas bajas concentraciones de oxígeno suponen también un ambiente permisivo donde la hipoxia estaría actuando como promotor tumoral en células que son genéticamente inestables y que han adquirido mutaciones oncogénicas (Bedogni and Powell, 2009).

La respuesta celular a la hipoxia está mediada principalmente por la familia de factores de transcripción HIF (*hypoxia inducible factors*), cuya regulación es un proceso altamente controlado por los niveles de oxígeno en las células (Figura 5) y donde HIF1 es considerado como el regulador central, activando la transcripción de los genes necesarios para la adaptación a la hipoxia (Semenza and Wang, 1992).

Sin embargo, existen también otras dos vías que de forma independiente a HIF influyen en la expresión génica implicada en la respuesta celular a la hipoxia, tanto en condiciones fisiológicas como en tumores: (i) a través de la regulación de la quinasa de mamífero diana de rapamicina (mTOR), que

participa en la regulación de síntesis de proteínas, autofagia y apoptosis, y (ii) la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*), que controla procesos de transcripción y traducción como consecuencia del estrés de ER (Wouters and Koritzinsky, 2008). Estas dos vías junto con HIF promueven de forma independiente la activación de autofagia, considerándose por tal motivo una respuesta importante en la tolerancia celular a la hipoxia (Wouters and Koritzinsky, 2008).



**Figura 5. Mecanismo de regulación de HIF.** En normoxia (21%  $O_2$ ) las prolilhidroxilasas (PHDs) hidroxilan a la subunidad  $\alpha$  de HIF (HIF- $\alpha$ ) en dos residuos prolina, que favorece la unión de la proteína von Hippel-Lindau (VHL). El complejo formado por HIF- $\alpha$ /VHL es ubiquitinado y degradado vía proteasoma. En hipoxia (1-2%  $O_2$ ), las PHDs no hidroxilan los residuos prolina de HIF- $\alpha$  evitando la unión de VHL y favoreciendo la entrada de HIF- $\alpha$  al núcleo. Una vez allí, forma un complejo con la subunidad  $\beta$ , también llamada ARNT. Este complejo HIF- $\alpha$ /ARNT se une a

secuencias HRE (*hypoxia response elements*) en el DNA, y con la ayuda del cofactor CBP/p300 promueve la transcripción de los genes diana.

### 2.2.5. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en el que se produce el transporte de componentes celulares en vesículas denominadas autofagosomas para su posterior digestión en los lisosomas (Levine and Kroemer, 2008). Como resultado, los productos procesados son devueltos desde los lisosomas al citoplasma con el objetivo de su posterior uso como nutrientes o como componentes en reacciones de biosíntesis. Es un proceso controlado por los genes atg (*autophagy-related genes*) que presentan una alta conservación evolutiva, y donde los genes *Atg8* y *Atg6*, con la nomenclatura *LC3* y *Beclin-1* respectivamente en mamíferos, juegan un papel central en la regulación de este proceso (Mizushima *et al.*, 2008).

En condiciones fisiológicas, la mayoría de los tipos celulares muestran una autofagia basal que se encarga de mantener la homeostasis celular. Sin embargo, las células pueden presentar una autofagia inducida que promueve la supervivencia celular en situaciones de estrés como daño genómico, estrés de ER, estrés oxidativo, carencia de nutrientes, infección vírica/bacteriológica e hipoxia (Eskelinen, 2011; Han *et al.*, 2011; Mizushima *et al.*, 2008). Aunque son varios los mecanismos que controlan la activación de autofagia en las células, mTOR es el gen central que regula este proceso.

El papel que juega la autofagia en cáncer despierta bastante controversia. Diversas investigaciones lo describen como un supresor tumoral mientras que otras lo consideran un proceso que favorece el desarrollo del tumor (Eskelinen, 2011). Se ha observado que *Beclin-1* está mutado en el 75% de los cánceres de ovario, en el 50% de mama y 40% de próstata (Aita *et al.*, 1999); y su sobre-expresión en modelos de ratón de cáncer de próstata aumenta la autofagia disminuyendo la tumorigenicidad (Liang *et al.*, 1999). Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL inhiben a su vez la autofagia (Hoyer-Hansen *et al.*, 2007; Maiuri *et al.*, 2007; Pattingre *et al.*, 2005), por lo que pueden promover la tumorigénesis no sólo bloqueando la apoptosis sino también inhibiendo la autofagia. A su vez, se ha visto que la autofagia protege del estrés genotóxico, ayudando a mantener la integridad del genoma, de tal forma que alteraciones en la autofagia podrían favorecer la adquisición de mutaciones en la célula que permitiera la supervivencia celular y el desarrollo tumoral (Degenhardt *et al.*, 2006; Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2007). Asimismo, la inducción de senescencia tanto por oncogenes como por daños en el DNA promueven la activación de autofagia restringiendo la proliferación de las células transformadas (Young *et al.*, 2009). Todos estos estudios demuestran el papel anti-tumoral de la autofagia, sin embargo también se ha detectado un aumento de autofagia en células tumorales, donde puede suponer una ventaja adaptativa con respecto a las células normales, ya que promueve la agresividad de las células y la resistencia a terapias, especialmente en tumores poco vascularizados que cursan con hipoxia y estrés celular (Eskelinen, 2011). Además, se ha descrito que la autofagia promueve la formación de metástasis confiriendo a las células tumorales resistencia a *anoikis* (Fung *et al.*, 2008).

Con respecto al melanoma, hay evidencias de que la adaptación al estrés de ER, que induce la activación de autofagia, es uno de los mecanismos que puede estar implicado en el desarrollo del melanoma maligno (Hersey and Zhang, 2008; Rutkowski and Kaufman, 2007). Se ha observado que las células invasivas del tumor presentes en la dermis muestran altos niveles de autofagia, lo que puede favorecer su supervivencia e invasión (Lazova *et al.*, 2010). Asimismo, tumores de melanoma que cursaban con VM mostraban también actividad autofágica asociada a un aumento significativo de expresión de Beclin-1 y LC3 (Han *et al.*, 2011). Además, el aumento de autofagia en melanomas humanos se ha asociado a una peor tasa de supervivencia en pacientes debido a que muestran una mayor resistencia a los quimioterapéuticos habituales, de la misma forma que presentan una mayor agresividad en xenotrasplantes en modelos de ratón (Ma *et al.*, 2011). Se ha observado también que el silenciamiento de Beclin-1 ó de Atg5 disminuye la autofagia en el melanoma, haciéndolo más sensible a los tratamientos (Marino *et al.*, 2010). Sin embargo en melanoma, al igual que en otros tipos de cáncer, también hay estudios que sugieren el papel de la autofagia como un supresor tumoral, en donde se observa que el tratamiento con diferentes drogas predispone a la muerte celular (Armstrong *et al.*, 2011; Tomic *et al.*, 2011).

## **OBJETIVOS**





PEDF es uno de los factores anti-angiogénicos endógenos más potentes que se conocen cuya actividad no está restringida al endotelio sino que también ejerce funciones anti-tumorales en diversos tipos de cáncer. En melanoma, nuestro laboratorio ha descrito mediante abordajes tanto *in vitro* como *in vivo*, los efectos anti-tumorales directos e indirectos de PEDF sobre las células del tumor y su microentorno. En resultados previos a la escritura de este trabajo de Tesis Doctoral observamos además que PEDF se expresa en melanocitos y que su expresión se va perdiendo durante la progresión maligna del melanoma, estando presente únicamente en aquellas líneas de melanoma clasificadas molecularmente como poco invasivas. PEDF limita la capacidad metastásica de las células de melanoma, y su pérdida supone la adquisición de características más agresivas que promueven la formación de metástasis.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos analizar la expresión de PEDF *in vivo* en el melanoma humano; así como identificar los mecanismos que regulan la pérdida de PEDF durante la progresión del melanoma.

Los objetivos concretos que se han abordado en esta Tesis Doctoral son:

1. Analizar el patrón de expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma humano
2. Identificar factores reguladores de la expresión de PEDF en melanocitos y células de melanoma humano:
  - 2.1. Regulación de PEDF por senescencia
  - 2.2. Regulación de PEDF por MITF
  - 2.3. Regulación de PEDF por hipoxia



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Cultivo celular

En la Tabla 1 se detallan las líneas celulares utilizadas durante el proyecto de tesis, origen y procedencia, así como los medios de cultivo en los que se crecieron. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37° C en atmósfera húmeda al 5% CO<sub>2</sub>.

**Tabla 1. Líneas celulares utilizadas**

Línea celular	Origen	Procedencia	Medio de cultivo
SBcl2	Melanoma cutáneo de crecimiento radial (Satyamoorthy <i>et al.</i> , 1997)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
WM278	Melanoma cutáneo de crecimiento vertical (Satyamoorthy <i>et al.</i> , 1997)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
WM164	Metástasis de melanoma cutáneo en nódulo linfático (Herlyn <i>et al.</i> , 1990)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
WM88	Metástasis de melanoma cutáneo	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
1205LU	Metástasis experimental de melanoma cutáneo en ratón (Juhász <i>et al.</i> , 1993)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
C8161	Metástasis de melanoma cutáneo en pared abdominal (Seftor <i>et al.</i> , 2005)	Dra. M. Hendrix	RPMI 10% FBS
C81-61	Metástasis de melanoma cutáneo en pared abdominal (Seftor <i>et al.</i> , 2005)	Dra. M. Hendrix	RPMI 10% FBS + 1x MITO **
MaMel69	Metástasis de melanoma cutáneo	Dr. D. Schadendorf	RPMI 10% FBS
MaMel82	Metástasis de melanoma cutáneo	Dr. D. Schadendorf	RPMI 10% FBS
M000921	Metástasis de melanoma cutáneo (Hoek <i>et al.</i> , 2006)	Dr. K. Hoek	RPMI 10% FBS
M080306	Metástasis de melanoma (Hoek <i>et al.</i> , 2006)	Dr. K. Hoek	RPMI 10% FBS
M010308	Metástasis de melanoma (Hoek <i>et al.</i> , 2006)	Dr. K. Hoek	RPMI 10% FBS
HEK-293T	Células del epitelio de riñón embrionario inmortalizadas con el antígeno T-largo del virus SV40 (DuBridge <i>et al.</i> , 1987)	Dr. A. Bernard	DMEM 10% FBS
IMR90	Fibroblastos humanos embrionarios (Nichols <i>et al.</i> , 1977)	Dr. I. Palmero	DMEM 10% FBS

Los medios DMEM (Gibco) y RPMI-1640 (Gibco) fueron suplementados con 2 mM glutamina (Gibco), 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ul estreptomycin (Gibco) y 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

\* Medio W489: Medio resultado de la mezcla 4:1 de medio MCDB 153 (Sigma) y medio L-15 (Invitrogen) suplementado con 2% FBS (Gibco), 5 µg/ul insulina (Sigma), 1,68 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck), 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ul estreptomycin (Gibco) y 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

\*\* Medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 1x MITO Serum Extender (BD Biosciences), 2 mM glutamina (Gibco), 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ul estreptomycin (Gibco) y 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

Además de las líneas humanas inmortalizadas, también se utilizaron cultivos primarios de melanocitos humanos de la piel, tanto comerciales (Lonza) como obtenidos en el laboratorio.

## **2. Obtención de cultivos primarios de melanocitos**

El establecimiento del cultivo de melanocitos en el laboratorio se llevó a cabo según se describe en el siguiente protocolo (modificado de (García-López *et al.*, 2005)):

1. Las muestras de piel se obtuvieron a partir de operaciones de fimosis de niños con edades comprendidas entre los 3-14 años realizadas en el Hospital Niño Jesús de Madrid, bajo consentimiento informado. Las muestras de piel son anónimas y se manipularon de forma independiente. Durante el periodo comprendido entre la operación y la recogida (no más de 5 días), las muestras se guardaron en PBS con antibióticos y antifúngico a 4° C.

2. Una vez en el laboratorio, las pieles se lavaron varias veces con PBS frío, antibióticos y antifúngico hasta eliminar los restos de sangre.

3. El tejido se cortó en fragmentos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, en una placa de cultivo, con la ayuda de unas pinzas y cuchilla.

4. Se añadieron 10 ml de 5 mg/ml dispasa II (Roche) y se incubaron toda la noche a 4° C.

5. Al día siguiente se realizó la separación mecánica de las epidermis y las dermis de cada uno de los trozos.

6. Se colocaron las epidermis en un tubo junto con 5 ml de 0,05% Tripsina/0,53 mM EDTA (Gibco) y se incubaron en un baño en agitación a 37° C durante 30 min.

7. Se pasaron las epidermis por una pipeta para ayudar mecánicamente a la disgregación de las células y se hicieron pasar por un filtro de 70 µm (*strainer*, BD) junto con 15 ml de suero para bloquear el efecto de la tripsina.

8. Se centrifugaron las muestras a 1200 rpm durante 5 min. Al finalizar, se aspiró el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 5 ml de medio 254 (M254) suplementado con HMGS (*Human Melanocyte Growth Factor*) (Cascade Biologics) y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

Aunque durante el proceso de obtención de melanocitos, se produce el arrastre de un porcentaje de queratinocitos, el medio de cultivo utilizado favorece el crecimiento de los melanocitos. Por otro lado, la tripsinización selectiva permite la eliminación de los queratinocitos debido a que requieren un tiempo de incubación con tripsina mayor que los melanocitos.

También se utilizaron cultivos primarios de melanocitos neonatales comerciales (Lonza). Estos melanocitos se crecieron en medio 4 (MGM-4<sup>TM</sup>, Lonza) suplementado con un cocktail de factores (BulletKit<sup>TM</sup>, Lonza). La limitación en el número de pases recomendados que se les pueden dar a estos cultivos (máximo 10 pases) restringe el número de experimentos que se pueden realizar con cada cultivo. Por esa razón, durante la realización de la Tesis se utilizaron diferentes cultivos de melanocitos, tanto comerciales como establecidos en el laboratorio a los que se asignó un número identificativos del aislamiento.

### 3. Hipoxia

Para crecer las células en condiciones de hipoxia, se utilizó una cámara de tipo *Hypoxystation H35* (Don Whitley Scientific Limited). La hipoxia se generó usando una mezcla de gas compuesta por 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 94 % N<sub>2</sub>, en atmósfera húmeda a una temperatura constante de 37° C. Alternativamente, las condiciones de hipoxia se mimetizaron mediante el uso del inhibidor de prolilhidroxilasas DMOG (Enzo), que impide la degradación de HIF en condiciones de normoxia.

### 4. Plásmidos

Se utilizaron los siguientes vectores de expresión plasmídicos, retrovirales, lentivirales y construcciones de regiones UTR fusionadas a renilla:

- **prrl.CMV.HRAS<sup>G12V</sup>.IRES.EGFP.wpre.SIN**. Vector de expresión lentiviral bicistrónico (tercera generación) de HRAS<sup>G12V</sup>, que expresa la proteína verde fluorescente mejorada EGFP. Este vector se construyó clonando el cDNA de HRAS<sup>G12V</sup> humano (amplificado por PCR a partir del vector lentiviral FG12-CMV, cedido por la Dra. M. Soengas) en el vector prrl.CMV.IRES.EGFP.wpre.SIN (cedido por el Dr. A. Bernard). Se amplificó por PCR del cDNA de HRAS<sup>G12V</sup> y se insertaron las dianas de XbaI y XhoI en los extremos 5' y 3' respectivamente, utilizando los cebadores 5'-ccgtctagataccatcacgatgttctga-3' (diana XbaI subrayada) y 5'-ccgctcgagtcaggagagcacacacttgc-3' (diana XhoI subrayada). A continuación, el cDNA amplificado se insertó en el vector de clonaje TA (Invitrogen) y por último, se clonó en el vector prrl.CMV.IRES.EGFP.wpre.SIN previamente digerido con XbaI y XhoI. Para la producción de lentivirus, el vector vacío prrl.CMV.IRES.EGFP.wpre.SIN fue usado como control. Las células transducidas con estos vectores pasarán a llamarse (línea celular)-HRAS<sup>G12V</sup> y (línea celular)-pRRL

- **pLPC-HRAS<sup>G12V</sup>**. Vector retroviral de expresión de HRAS<sup>G12V</sup> humano que se encuentra bajo el promotor constitutivo del citomegalovirus (CMV). Como control se utilizó el vector vacío pLPC. Cedidos por el Dr. I. Palmero. Las células transducidas con retrovirus donde se hayan empaquetado estos vectores pasarán a llamarse (línea celular)-HRAS<sup>G12V</sup> y (línea celular)-pLPC

- **pCEP4-PEDF**. Vector de expresión de la región codificante de PEDF humano (sin regiones UTR) que se encuentra bajo el promotor constitutivo CMV y que presenta además un *tag* de 6 histidinas en posición 3'. Como control se utilizó el vector vacío pCEP4. Cedidos por la Dra. N. Bouck. Las células transfectadas con estos vectores pasarán a llamarse (línea celular)-pCEP4-PEDF y (línea celular)-pCEP4.

- **pLV-EGFP-LC3.** Vector de expresión de LC3 humano que se encuentra bajo el promotor del CMV. Cedido por la Dra. M. Soengas. Las células transducidas con lentivirus donde se haya empaquetado este vector pasarán a nombrarse como (línea celular)-LC3.

- **Vectores lentivirales de interferencia.** Para silenciar la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) de HIF1 $\alpha$ , LC3 y MITF humano, se utilizaron vectores lentivirales de segunda generación (pGIPz) que expresan secuencias de interferencias shRNA<sup>mir</sup> específicas para cada uno de los mRNA que se desea silenciar (todas ellas de Open Biosystems). Bajo el promotor CMV se transcribe un mRNA bicistrónico que da lugar a la *Turbo-GFP*, la resistencia a la puomicina y a la secuencia shRNA<sup>mir</sup>, que es una secuencia híbrida en la que se incorporan la secuencia del microRNA-30 humano (miR30) y la secuencia shRNA (*short hairpin* RNA) para interferir específicamente la expresión de HIF1 $\alpha$ , LC3 ó MITF (Chang *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2005). En la Tabla 2 se detallan las secuencias de silenciamiento utilizadas así como la nomenclatura de las células transducidas con lentivirus que expresen estos vectores.

**Tabla 2. Vectores virales de interferencia**

mRNA	Vector	Secuencia de interferencia	Nomenclatura
HIF1 $\alpha$	pGIPz-shRNA <sup>mir</sup> -HIF1 $\alpha$	V2LHS_132150	(línea celular)-shHIF1 $\alpha$
LC3	pGIPz-shRNA <sup>mir</sup> -LC3	V3LHS_408637	(línea celular)-shLC3
MITF	pGIPz-shRNA <sup>mir</sup> -MITF	V2LHS_257541	(línea celular)-shMITF

Como control en los vectores de interferencia, se utilizó el vector pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>-NS (Open Biosystems) que presenta una secuencia shRNA<sup>mir</sup> NS (*Non-silencing*) que no presenta homología con ningún gen de mamíferos conocido. Las células transducidas con lentivirus control pasarán a llamarse (línea celular)-shNS.

- **Vectores utilizados en ensayos reporteros.** Para medir la actividad de las regiones 3' UTR de *PEDF* y *GAPDH* humano, dichas regiones se insertaron en el extremo 3' del gen de Renilla del vector psiCHECK<sup>TM</sup>-2 (Promega) que presenta expresión constitutiva de Luciferasa bajo el promotor del *simian virus 40* (SV40). Para ello, se amplificaron por PCR las regiones 3' UTR del mRNA de *PEDF* y *GAPDH*, introduciendo sitios diana para XhoI y NotI en los extremos 5' y 3' respectivamente. El producto amplificado se insertó en el vector TA y por último se clonó en el vector psiCHECK<sup>TM</sup>-2 previa digestión con XhoI y NotI. Los cebadores utilizados en la PCR así como la nomenclatura de cada construcción están descritos en la Tabla 3. Como control en los ensayos reporteros, se utilizó el vector vacío psiCHECK<sup>TM</sup>-2.



**Tabla 3. Cebadores utilizados en la amplificación de las regiones 3'UTR de PEDF y GAPDH y la nomenclatura de los plásmidos resultantes.**

	Cebador directo 5'-3' (diana XhoI subrayada)	Cebador reverso 5'-3' (diana NotI subrayada)	Nomenclatura
3'UTR - PEDF	cgctcgagtatcccagtttaattcc	cagcgccgcgctaacagaagttaggataa	psiCHECK-3'PEDF
3'UTR - GAPDH	cgctcgaggaccctggaccaccagc	cagcgccgcggttgagcacagggtac	psiCHECK-3'GAPDH

## 5. Generación de partículas lentivirales

Se produjeron partículas lentivirales, que presentan tropismo humano (lentivirus anfotrópicos) y son deficientes para replicación, para la sobre-expresión de LC3 (utilizando vectores de tercera generación) y para la interferencia de HIF1 $\alpha$ , LC3 y MITF (mediante vectores de segunda generación). El procedimiento utilizado es el siguiente (modificado de (Punzon *et al.*, 2004)):

Se sembraron células HEK-293T a una escala de  $7.10^6$  células por placa de 10 cm<sup>2</sup>. Pasadas 24 h, se cambió el medio por 9 ml DMEM (Gibco) junto con 30  $\mu$ M cloroquina (Sigma) por placa y se realizó la transfección con fosfato cálcico durante 8 h de una mezcla de plásmidos compuesta por:

1. Vector: 14,2  $\mu$ g
2. Plásmido(s) empaquetador(es): 12,45  $\mu$ g de psPAX2 si son virus de segunda generación (pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>), ó 9  $\mu$ g de RRE y 3,45  $\mu$ g de REV para la generación de virus de tercera generación (prrl.CMV.IRES.EGFP.wpre.SIN y pLV-EGFP-LC3).
3. Plásmido de la envuelta (envuelta glicoproteica del virus de la estomatitis vesicular (VSVg)): 4,5  $\mu$ g de pMD2G

Finalizado ese tiempo, se cambió el medio por DMEM 10% FBS y se incubaron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, se renovó el medio cuidadosamente. Pasadas 24 h, se observaron al microscopio el número de células GFP positivas para evaluar la eficiencia de transfección (que debe estar en torno al 90-100% de células verdes), y se recogieron los sobrenadantes. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, y tras pasarlos por filtros de 0,45  $\mu$ m, se guardaron en alícuotas a -80 °C hasta su posterior uso.

La titulación de los sobrenadantes se llevó a cabo en células HEK-293T para los lentivirus de sobre-expresión (-LC3, pRRL-HRAS<sup>G12V</sup> y su control pRRL) y en la línea de melanoma SBcl2 para los lentivirus de interferencia (-shHIF1 $\alpha$ , -shLC3, -shMITF y su control -shNS). Para ello se determinó el porcentaje de células GFP positivas a las 72 h de la infección mediante separación celular activada por fluorescencia (FACS) obteniendo como media títulos de  $1-2.10^6$  TU/ml. El título es el valor resultante de la fórmula:

$$\text{TU/ml} = (\% \text{ células GFP positivas} / \text{n}^\circ \text{ células en la infección}) / \text{volumen virus (ml)}$$

En aquellos casos en los que se necesitó aumentar el título de los sobrenadantes, se llevó a cabo su concentración mediante ultracentrifugación. Para ello, el día de recogida de los sobrenadantes, después de pasar por filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ , se transfieren los sobrenadantes a tubos 344058 (Beckman) y utilizando un rotor SW28 (Beckman) se centrifugaron a 19700 rpm durante 2 h. Después de eliminar los sobrenadantes, se resuspendieron los sedimentos de partículas virales en 150 – 200  $\mu\text{l}$  PBS frío en agitación durante 2 h y se hicieron alicuotas que se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

## **6. Generación de partículas retrovirales**

Para la sobre-expresión de HRAS<sup>G12V</sup> en fibroblastos humanos (IMR90) se produjeron partículas retrovirales que presentaban tropismo humano (anfotrópico) y eran deficientes para replicación. El procedimiento utilizado fue el siguiente (modificado de (Goeman *et al.*, 2005)):

Se sembraron células HEK-293T a una confluencia del 70% en placas de 10  $\text{cm}^2$ . Pasadas 24 h, se realizó la transfección con fosfato cálcico durante 8 h en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de cloroquina de una mezcla de plásmidos compuesta por:

1. Vector de interés: 10  $\mu\text{g}$
2. Vector anfotrófico (contiene los genes virales implicados en el empaquetamiento y la envuelta): pCLEco 10  $\mu\text{g}$

A las 48 h de la transfección, se recogieron los sobrenadantes y tras centrifugarlos a 1200 rpm durante 5 min se diluyeron 1:2 en medio DMEM fresco, se pasaron por filtros 0,45  $\mu\text{m}$  y se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$  en alicuotas hasta su posterior utilización.

## **7. Generación de líneas celulares de expresión transitoria ó estable**

### **7.1. Transducción por infección lentiviral**

Para la sobre-expresión de LC3 o interferencia de HIF1 $\alpha$ , LC3 y MITF en cultivos primarios de melanocitos y líneas de melanoma, se utilizaron sobrenadantes lentivirales a una multiplicidad de infección (MOI) de 10-80, dependiendo de la línea celular. La transducción se realizó en presencia de 8  $\mu\text{g/ml}$  polibreno (Sigma) durante 8 h, observando a las 24-48 h un porcentaje de células GFP positivas (células transducidas) cercano al 90-100%. A las 72 h se chequeó el grado de sobre-expresión o interferencia tanto por *Western blot* de los extractos celulares como por RT-PCR cuantitativa.

## 7.2. Transducción por infección retroviral

Para la sobre-expresión de HRAS<sup>G12V</sup> en cultivos de fibroblastos humanos (IMR90), partimos de sobrenadantes retrovirales diluidos previamente 1:2 en DMEM fresco. Se sembraron células IMR90 a una escala de  $8 \cdot 10^5$  células por placa de 10 cm<sup>2</sup> y se realizó la infección en presencia de 8 µg/ml de polibreno. Pasadas 12 h, se volvió a repetir la infección esta vez con 4 µg/ml de polibreno, y 24 h después de la primera infección se volvió a añadir sobrenadante retroviral con 8 µg/ml de polibreno. A las 24 h de la última infección, se añadió medio fresco y se llevó a cabo la selección de las células con 2 µg/µl de puomicina (Calbiochem-Novabiochem Corp.) durante 3-5 días.

## 7.3. Transfección de células

Para la expresión ectópica del cDNA de PEDF sin regiones UTR en las líneas de melanoma SBcl2 y M000921, se realizó la transfección de 8 µg de plásmido pCEP4-PEDF o su control pCEP4 en presencia de 10 µl Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 1 ml OptiMEM (Gibco) durante 4 h en placas de 21 cm<sup>2</sup>. Después de 48 h se llevó a cabo la selección de las células transfectadas mediante tratamiento con 300 µg/ml higromicina B (Sigma) durante dos semanas. Por último, se caracterizó la sobre-expresión de PEDF mediante *Western blot* en extractos celulares.

## 8. Ensayos reporteros de UTR

Para medir la actividad de las regiones 3' UTR de PEDF y GAPDH se transfectaron las líneas de melanoma SBcl2 y M000921 con 300 ng de los plásmidos psiCHECK-3'PEDF, psiCHECK-3'GAPDH ó su control psiCHECK junto con 1 µl Lipofectamina 2000 en 100 µl OptiMEM durante 4 h en placas de 24 pocillos. Pasado ese tiempo, se añadió medio fresco y se incubaron 24 h a 37° C. A continuación se crecieron las células en condiciones de hipoxia (1% O<sub>2</sub>) y de normoxia (21% O<sub>2</sub>) durante otras 24 h. Finalizado el tratamiento, se congelaron las placas a -80° C y posteriormente se lisaron las células para analizar las actividades de Renilla y Luciferasa con el *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) en un luminómetro *Lumat LB9507* (Berthold Technologies). La actividad Renilla se normalizó por la actividad Luciferasa, calculando las medias y desviaciones estándar. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

## 9. Análisis de proteínas

### 9.1. Preparación de medios condicionados de cultivos celulares

Para la detección de PEDF extracelular, se sembraron las células en placas de 21 cm<sup>2</sup>, y 24 h después, cuando presentaron una confluencia del 70%, se lavaron con PBS frío tres veces y se incubaron en medio basal sin suero durante 8 h, 16 h ó 24 h, dependiendo del diseño del experimento.

Se recogieron los medios condicionados (MC), se centrifugaron a 1500 rpm para eliminar los restos celulares, se añadió 1 mM PMSF (Sigma) y se concentraron por centrifugación a 4° C con concentradores *Amicon Ultra* (Milipore), con un tamaño de exclusión de 10 kDa. Se lavó el concentrado tres veces y se concentró unas 50 veces hasta un volumen final aproximado de 160 µl. Por último, se hicieron alicuotas del MC concentrado que se guardaron a -80° C.

### **9.2. Extracción de proteínas celulares**

Los extractos de proteínas celulares se obtuvieron homogeneizando las células, tras un lavado con PBS, con dos tipos de tampones:

- **Tampón Laemli** [50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% dodecil sulfato sódico (SDS), 10% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 100 mM ditioneitol (DTT)]. Se usó este tampón para lisar las células utilizadas en los experimentos de normoxia/hipoxia. Tras la lisis, se homogeneizaron mecánicamente los extractos usando agujas de 23 G para fragmentar el DNA, se hirvieron las muestras 5 min a 100° C y se almacenaron a -80° C. En estos extractos no es posible cuantificar la cantidad de proteína total.

- **Tampón RIPA** [50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,02% azida sódica, 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% deoxicolato sódico, inhibidores de fosfatasa y proteasas (10 µg/ml ortovanadato sódico, 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml aprotinina, 1 mM PMSF)]. La lisis se realizó en hielo durante 15 min. Posteriormente, se usaron agujas de 23 G para fragmentar el DNA y se centrifugaron a 12000 rpm a 4° C durante 15 min para descartar los restos celulares. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el kit *BioRad DC protein assay* (compatible con detergentes y basado en el método Lowry). Finalmente, se añadió tampón Laemli a los extractos, se hirvieron 5 min a 100° C y se almacenaron a -80° C.

### **9.3. Inmunodetección de proteínas mediante *Western blot***

Las muestras de proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS), en los que se cargaron entre 15-20 µl de MC concentrado ó 15-30 µg de extractos proteicos por cada carril del gel. A continuación, los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Pall Corporation) mediante transferencia líquida (20% metanol, 39 mM glicina y 48 mM tris) a 100 V a 4° C durante 2 h aproximadamente. Las membranas se incubaron en tampón de bloqueo (0,1% Tween-20, 5% leche en polvo desnatada en TBS) a temperatura ambiente durante 1 h, y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 4) diluidos en tampón de bloqueo a 4° C toda la noche. Al día siguiente, tras lavar tres veces con 0,1% Tween-20 en TBS, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Tabla 5) diluido en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se lavaron de nuevo tres veces las membranas, y la detección de las

bandas se realizó mediante reacción de quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amersham) utilizando películas autorradiográficas (Konica).

**Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados para *Western blot* (WB) e inmunohistoquímica (IHQ)**

Anticuerpo	Especie	Procedencia	Dilución	
			WB	IF / IHQ
PEDF humano	Ratón	Chemicon	1:1200	
PEDF humano	Conejo	Bioproducts	1:1500	1:1000
HIF1 $\alpha$ humano	Ratón	BD Transduction Laboratories	1:1000	
HIF2 $\alpha$ humano	Conejo	Abcam	1:1000	
p62 humano	Conejo	Cell Signaling	1:1000	
LC3 humano	Conejo	Cell Signaling	1:1000	
5-HIS	Ratón	Qiagen	1:2000	
$\beta$ -actina humana	Cabra	Santa Cruz	1:1000	
$\beta$ -tubulina humana	Ratón	Sigma	1:10000	
MITF humano	Ratón	Neomarkers Labvision, clón C5	1:200	
RAS humano	Ratón	Calbiochem	1:2000	
Ki67 humano	Ratón	Dako, clón MIB-1		1:100
IL8 humano	Ratón	RD Systems	1:500	
p16 humano	Ratón	Gordon Peters CRUK	1:200	
p16 humano	Ratón	Santa Cruz		1:50
BrdU	Conejo	Megabase		1:1000

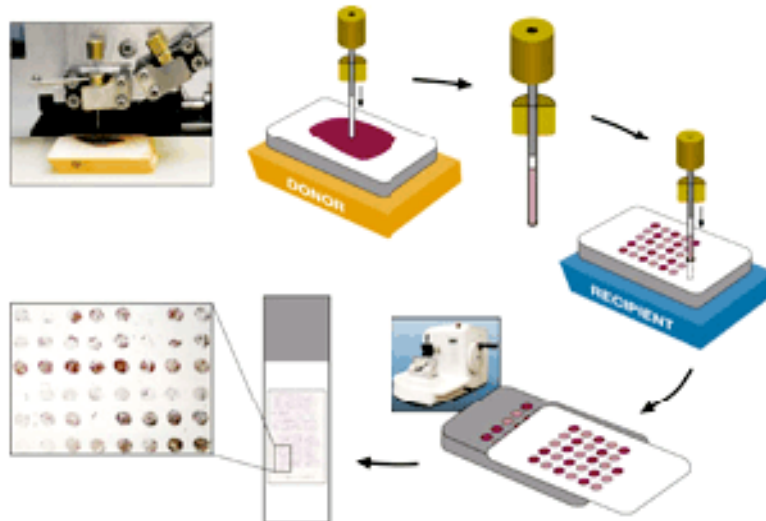
**Tabla 5. Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa para *Western blot***

Anticuerpo	Especie	Procedencia	Dilución
IgG de ratón	Cabra	Promega	1:4000
IgG de conejo	Cabra	MP Biomedicals	1:10000
IgG de cabra	Burro	Santa Cruz	1:4000

## 10. Histología e inmunohistoquímica

### 10.1. Realización de matrices tisulares o *Tissue Microarray* (TMA)

Para la caracterización de la expresión de PEDF durante la progresión maligna de melanoma, un total de 204 muestras de tejido, incluyendo *naevus* intratérmico (n=15), melanoma primario en fase de crecimiento radial (RGP) (n=20), melanoma primario en fase de crecimiento vertical (VGP) (n=35), metástasis en piel (n=40), metástasis en nódulo linfático (n=38) y metástasis viscerales (n=22) fueron seleccionadas de los archivos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid para la construcción de los *Tissue Microarrays* (TMA) (Figura 6). Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron tratados por el Departamento de Oncología del hospital y dieron su consentimiento informado de acuerdo a la ley biomédica 14/2007.



**Figura 6. Esquema de la construcción de un TMA.** (1) Selección del material: bloques donantes. (2) Selección de la zona a recortar dentro del bloque donante. (3) Diseño de la plantilla del TMA que se plasmará en el bloque receptor. (4) Realización del TMA: recortando sucesivamente los bloques donantes para posteriormente introducir los cilindros de tejido en el bloque receptor. (5) Cortes y tinciones de los TMA.

Se seleccionaron dos cilindros o *cores* de tejido de 1,5 mm de diámetro de las zonas representativas de cada bloque de parafina donante y se introdujeron en el bloque de parafina receptor mediante un *Arrayer* (Beecher Instruments) de precisión. Para evaluar de la forma más correcta los tumores, en lesiones de gran tamaño se seleccionaron *cores* del borde invasivo del tumor y se utilizó toda la región tumoral en lesiones pequeñas. Además, se añadieron muestras de tejido normal (piel, amígdala y tejido linfoide) de forma adyacente a los *cores* tumorales que sirvieron de control interno del *array* en las inmunohistoquímicas. Los cortes iniciales del TMA fueron teñidos con hematoxilina-eosina (Dako) para comprobar la disposición y el estado histopatológico de las lesiones seleccionadas.

## 10.2. Inmunohistoquímica en bloques de parafina

Se utilizaron secciones de 3  $\mu\text{m}$  de grosor tanto para el análisis inmunohistoquímico de los TMA como para bloques de parafina de biopsias de melanoma. El análisis de la expresión de PEDF, p16 y Ki67 se llevó a cabo utilizando el sistema automatizado *BondTM* (Leica Microsystems) en la unidad de Inmuhistoquímica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Tras la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4), la inmunodetección se realizó mediante un *BondTM Polymer Refine Detection* (Leica Microsystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina (Dako) y montadas con el medio de montaje hidrofóbico DPX (Dako).

### 10.3. Valoración de los TMA

La especificidad de la tinción de PEDF y p16 en los TMA fue evaluada por el Dr. José Luis Rodríguez-Peralto, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. La valoración de la tinción se basó en una combinación de dos criterios: el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción. El *score* utilizado fue: 0 – PEDF negativo (no expresión), 1 – PEDF bajo (menos del 50% de células con tinción de alta intensidad) y 2 – PEDF alto (más del 50% de células con tinción de alta intensidad). Las discrepancias que se pudieron encontrar se resolvieron mediante re-evaluación del TMA. Para la tinción de Ki67 se determinó el porcentaje de expresión mediante el uso de un microscopio automatizado con scanner y el sistema de análisis computerizado *Ariol SL-50* (Genetix) en la unidad de Inmunohistoquímica del Centro de Investigaciones Oncológicas de Madrid (CNIO).

## 11. Análisis de RNA

### 11.1. Extracción de RNA total

- **Células en cultivo:** la extracción de RNA total se realizó con el reactivo *TRI-REAGENT* (Molecular Research Center Inc.) o mediante purificación por columnas utilizando el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción del RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) se realizó un tratamiento con DNAsa I (Quiagen) y posteriormente se llevó a cabo la purificación por columnas (*RNeasy Mini Kit* )

- **Tejido congelado:** la extracción de RNA total de biopsias de melanoma congeladas en OCT (medio de montaje que asegura una temperatura de corte óptima) requirió una combinación de extracción con *TRI-REAGENT* junto con una posterior purificación por columnas utilizando el *RNeasy Mini Kit*. Primero se realizaron 10-20 cortes por muestra de 10 µm que se almacenaron en tubos a -80° C. Se añadió 1 ml de Trizol a cada tubo, se homogeneizaron las muestras con agujas de 23 G y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo, y después de vortexearlas se incubaron a temperatura ambiente 15 min para posteriormente centrifugar los tubos a 12000 rpm 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se transfirieron las fases acuosas a tubos limpios donde se añadió a cada muestra 600 µl de 70% etanol a -20° C. El resultado de la mezcla se transfirió a las columnas del kit *RNeasy Mini Kit* y se siguieron las instrucciones del fabricante del mismo modo que en la extracción de RNA de cultivos celulares.

Para ambas condiciones, la concentración de RNA extraído se determinó espectrofotométricamente en un *NanoDrop Spectrophotometer ND-100* (NanoDrop Biotechnologies). Además se analizó electroforéticamente en geles al 1% de agarosa teñidos con *SYBERSafe DNA Gel Stain* (Invitrogen).

## 11.2. RT-PCR Cuantitativa

Los niveles de mRNA se determinaron mediante ensayos de RT-PCR cuantitativa realizados en el Servicio de Secuenciación del IIBM mediante el uso de sondas *TaqMan*, y en nuestro laboratorio utilizando cebadores específicos para detectar los niveles de cada mRNA.

En los ensayos con sondas *TaqMan*, para la síntesis de cDNA se retrotranscribieron 250 ng de RNA con el *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems). A continuación, se diluyó el cDNA hasta una concentración final de 2,5 ng/μl y se llevó a cabo la reacción con 2 μl de producto de cDNA, 0,5 μl sonda *TaqMan* 20x, 5 μl *Master mix* 2x (Applied Biosystems) y 2,5 μl de agua destilada en un termociclador *ABI Prism 7900 HT* (Applied Biosystems). Las sondas *TaqMan* utilizadas fueron: *18s rRNA* (Hs99999901\_s1), *GAPDH* (Hs99999905\_m1), *PEDF* (Hs00171467\_m1), *LC3B* (Hs00797944\_s1), *VEGF* (Hs00173626\_m1), *TYR* (Hs00165976\_m1) y *MITF* (Hs00165156\_m1).

En los ensayos para detectar los niveles de mRNA de *HIF1α*, *BNIP3*, *β-actina* y *28s rRNA* mediante cebadores específicos (Tabla 6) se retrotranscribió 1 μg de RNA total mediante el uso del *Improm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (Promega). Posteriormente, utilizando 1 μl de cDNA se realizó la reacción de PCR cuantitativa con el *LightCycler-FastStart PLUS DNA Master SYBR Green I Kit* (Roche). Para la detección de hnRNA de *MITF*, *PEDF* y *TYR* se siguió el mismo protocolo difiriendo únicamente en los cebadores utilizados (Tabla 7).

Los datos fueron analizados por el método de cuantificación relativa por compensación de  $C_T$  (*threshold cycle*, umbral de detección establecido). En este método se calcula la media entre los triplicados, y los niveles de expresión del gen de interés se normalizan por la media de los triplicados del gen constitutivo utilizado (*GAPDH*, *18s rRNA* ó *28s rRNA*). A continuación, la cantidad de mRNA del gen de interés de una muestra determinada (m) se expresa en relación a los niveles de dicho mRNA en una muestra calibradora (c), de tal modo que la cantidad relativa de un gen de interés en una muestra m es igual a  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , donde  $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_m - (\Delta C_T)_c$ , siendo  $\Delta C_T = C_T$  gen de interés –  $C_T$  gen constitutivo.

Todos los resultados fueron confirmados en al menos tres experimentos independientes.

**Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección de mRNA en RT-PCR cuantitativa**

mRNA	Cebador directo 5' – 3'	Cebador reverso 5' – 3'
<i>HIF1α</i>	gttactaaggacaagtcacc	ttctgtttgtgaaggag
<i>BNIP3</i>	gtctggacggagtagc	ggccgacttgaccaat
<i>β-actina</i>	cccagagcaagagagg	gtccagacgcaggatg
<i>28s rRNA</i>	cagtacgaatacagaccg	ggcaacaacacatcatcag



Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección del hnRNA en RT-PCR cuantitativa

hnRNA	Cebador directo 5' – 3'	Cebador reverso 5' – 3'
<i>PEDF</i>	ccctcgaggatttctacttgg	gctgtcggatctcaaaggtc
<i>MITF</i>	cgaagtgcaacgagaaca	gtcaactccctatggetca
<i>TYR</i>	gagtacatgggaggtcagca	aacagggcaccatttctgtc

### 11.3. Gradientes de polisomas

Tras crecer las células en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 h, se trataron con 0,1 mg/ml cicloheximida (Sigma) durante 10 min para parar la traducción. Posteriormente, las células se lisaron en tampón de lisis PEB (0,3 M NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM tris-HCl, 1% Triton X-100, pH 7,6) en hielo durante 10 min y se centrifugaron los extractos totales a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. Tras medir la concentración de proteína por el método de Lowry (Biorad), se realizó al fraccionamiento de 1 mg de extracto mediante un gradiente formado por soluciones de sacarosa de concentración creciente (10%, 20%, 30% y 40%) en un tampón de sales (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 M MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Se centrifugaron los extractos en los gradientes usando un rotor SW41 a 39.000 rpm durante 2 h en condiciones de máxima aceleración y frenado. Tras la centrifugación, el gradiente se dividió en once fracciones de las que se extrajo el RNA total con el reactivo *TRI-REAGENT* y seguidamente se procedió a la detección del mRNA de *PEDF*, *HIF1* y *GAPDH* mediante RT-PCR cuantitativa usando sondas *TaqMan*.

## 12. Ensayo de metaloproteinasas

Para determinar la actividad de las metaloproteinasas del medio condicionado sobre PEDF, se mezclaron un total de 100 ng de proteína PEDF humana recombinante (rhuPEDF) con 10 µl de medio condicionado de cultivos de melanocitos primarios ó de la línea de melanoma SBcl2, tanto directo como concentrado. El inhibidor de la actividad de las metaloproteinasas EDTA (Sigma) se añadió a la mezcla en los casos señalados. La mezcla se incubó durante 1 h a 37° C y posteriormente se procedió a la detección de PEDF (tanto endógeno como recombinante) por *Western blot*.

## 13. Ensayos de proliferación celular

### 13.1. Incorporación de EdU

Para medir la síntesis de DNA en cultivos primarios de melanocitos y en la línea de melanoma SBcl2 se analizó la incorporación de 5-etinil-2-deoxiuridina (EdU) mediante el kit *Click-iT EdU Imaging Kit* (invitrogen). Se sembraron entre 15.10<sup>4</sup> – 20.10<sup>4</sup> células, dependiendo de la línea celular, en cubreobjetos de cristal de 10 mm en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, se incubaron con 20

$\mu$ M EdU en pulsos de 6 h, 16 h y 24 h en medio con suero. Al finalizar el tratamiento, las células se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS y se procesaron según las instrucciones del kit. Las células EdU positivas se contaron en un mínimo de seis campos diferentes en un microscopio confocal *TCS SP5 DMI6000* (Leica Microsystems). Para determinar el número total de células por campo, los núcleos se tiñeron con 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), y se contaron al menos 500 núcleos por condición usando el programa *ImageJ* (NIH, USA). Se calculó la media y desviación estándar de los triplicados. Cada experimento se realizó tres veces.

### **13.2. Incorporación de BrdU**

En el cultivo de fibroblastos IMR90, el ratio de síntesis de DNA se analizó por incorporación de 5-bromo-2'-desoxyuridina (BrdU). En cubreobjetos de cristal de 10 mm, en placas de 8 pocillos, se sembraron en torno a  $2 \cdot 10^4$  células por pocillo. Al día siguiente, se incubaron durante 4 h con BrdU a una concentración final de 10  $\mu$ M. Finalizado ese tiempo, se fijaron las células con 4% paraformaldehído en PBS y las células positivas para BrdU fueron detectadas mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-BrdU. Para determinar el número total de células, se tiñeron los núcleos con DAPI y se contaron un mínimo de 200 células por cada condición mediante el uso del programa *ImageJ* (NIH, USA). Se calculó la media y desviación estándar de los triplicados. Cada experimento se realizó al menos tres veces.

## **14. Ensayo de actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -gal)**

Para determinar el estado de senescencia en cultivos celulares, se analizó la actividad beta-galactosidasa mediante tinción con X-gal (Promega).

Se partió de cultivos primarios de melanocitos y fibroblastos IMR90 que se sembraron a una densidad de  $2 \cdot 10^4$  células en placas de 6 pocillos. A las 24 h de la siembra, se lavaron 2 veces con PBS frío y se fijaron las células con una mezcla de 2% formaldehído y 0,2% glutaraldehído en PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, se incubaron las células con la solución de tinción (1 mg/ml X-gal en dimetilformamida, 40 mM a pH 6 ácido cítrico / fosfato sódico di-hidratado, 5 mM ferrocianuro de potasio, 5 mM ferricianuro de potasio, 150 mM NaCl y 2 mM  $MgCl_2$  en agua destilada) a 37° C toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las células con agua destilada y se sacaron fotos con un microscopio de luz visible a 20x aumentos.

Para la cuantificación de las células teñidas se fotografiaron 20 campos por condición y se obtuvo la media y la desviación estándar de los triplicados.

## **15. Análisis estadístico de los datos**

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa informático *GraphPad Prism* (GraphPad Software). Para la comparación de dos grupos de datos, se utilizó el test de Student (*t-test*) no pareado de dos colas o el test de Student no pareado de dos colas con corrección de Welch (para aquellas comparaciones donde los grupos experimentales presentan varianzas diferentes). Cuando se compararon simultáneamente más de dos valores medios, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con una comparación múltiple post-test Tukey-Kramer. Para el análisis de frecuencias observadas (variables cualitativas) en la valoración de los TMA se utilizó un test de contingencia Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y para determinar correlación entre factores se realizó un análisis de correlación de Pearson.

Los valores de probabilidad (*p*) iguales o inferiores a 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*,  $P < 0,0001$ ).



## **RESULTADOS**



## 1. EXPRESIÓN DE PEDF EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DEL MELANOMA HUMANO

PEDF es un factor multifuncional que se expresa de forma ubicua en el organismo. En los últimos años, son varios los estudios que demuestran el importante papel anti-tumoral de PEDF en una gran diversidad de tumores, incluyendo el melanoma. En este último, nuestro laboratorio, junto con otros grupos, ha demostrado los efectos de PEDF tanto sobre las propias células del melanoma como sobre la vasculatura del tumor (Abe *et al.*, 2004; Fernandez-Garcia *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2004). En un trabajo previo describimos además que PEDF se expresa a niveles elevados en melanocitos y que su expresión se va perdiendo durante la progresión del melanoma. Observamos que PEDF está presente únicamente en líneas de melanoma clasificadas molecularmente como poco invasivas, sin embargo, la pérdida de este factor conlleva la adquisición de características agresivas, facilitando la invasión y la formación de metástasis (Orgaz *et al.*, 2009).

La existencia de una relación directa entre la pérdida de expresión de PEDF en células de melanoma y la adquisición de un fenotipo con características más agresivas se basa en la combinación del análisis de la expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma humano y estudios funcionales. En el presente trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos analizar la expresión de PEDF en biopsias de melanoma humano clasificadas según el criterio histopatológico de agresividad en las fases radial, vertical y metastásica.

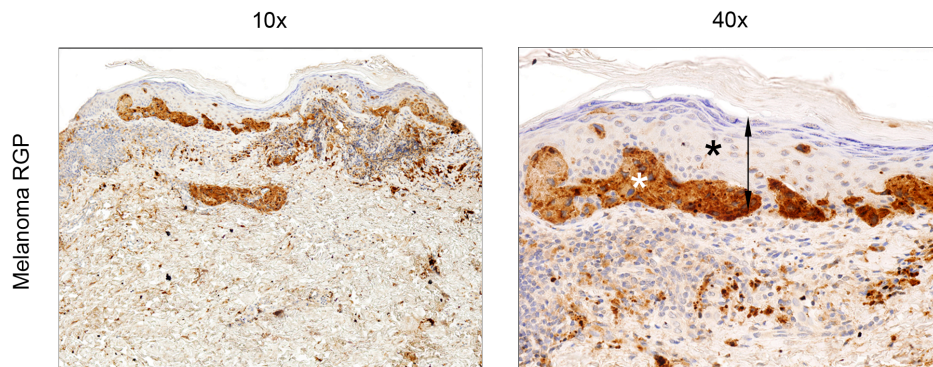
### 1.1. En biopsias humanas, la expresión de PEDF disminuye durante la progresión maligna del melanoma

Una de las principales características del melanoma es su naturaleza heterogénea, manifestada tanto en la morfología como en los marcadores moleculares de las células que componen la lesión (Banerjee and Harris, 2000; Hoek *et al.*, 2008). Por este motivo, el estudio *in vitro* de PEDF se llevó a cabo analizando su expresión en líneas de melanoma que habían sido caracterizadas según el modelo del *phenotype switching*, que clasifica las células en perfiles o cohortes proliferativo e invasivo de acuerdo a su huella de expresión molecular. Para validar estos resultados *in vivo* debería analizarse la expresión de PEDF en biopsias de melanoma humano clasificadas según su perfil de expresión génica. Sin embargo este abordaje no estaba a nuestro alcance, por lo que decidimos analizar la expresión de PEDF en biopsias de melanoma clasificadas según el modelo utilizado tradicionalmente en clínica para el diagnóstico y seguimiento del melanoma humano.

## Resultados

Analizamos la expresión de PEDF en melanoma mediante inmunohistoquímica en *Tissue Microarrays* (TMA) de cada uno de los estadios de la progresión maligna del melanoma caracterizados histopatológicamente. En total se usaron 6 TMA correspondientes a las fases de: *naevus* intradérmico (n=15), melanoma primario en fase de crecimiento radial (RGP) (n=20), melanoma primario en fase de crecimiento vertical (VGP) (n=35), metástasis en piel (n=40), metástasis en nódulo linfático (n=38) y metástasis visceral (n=22).

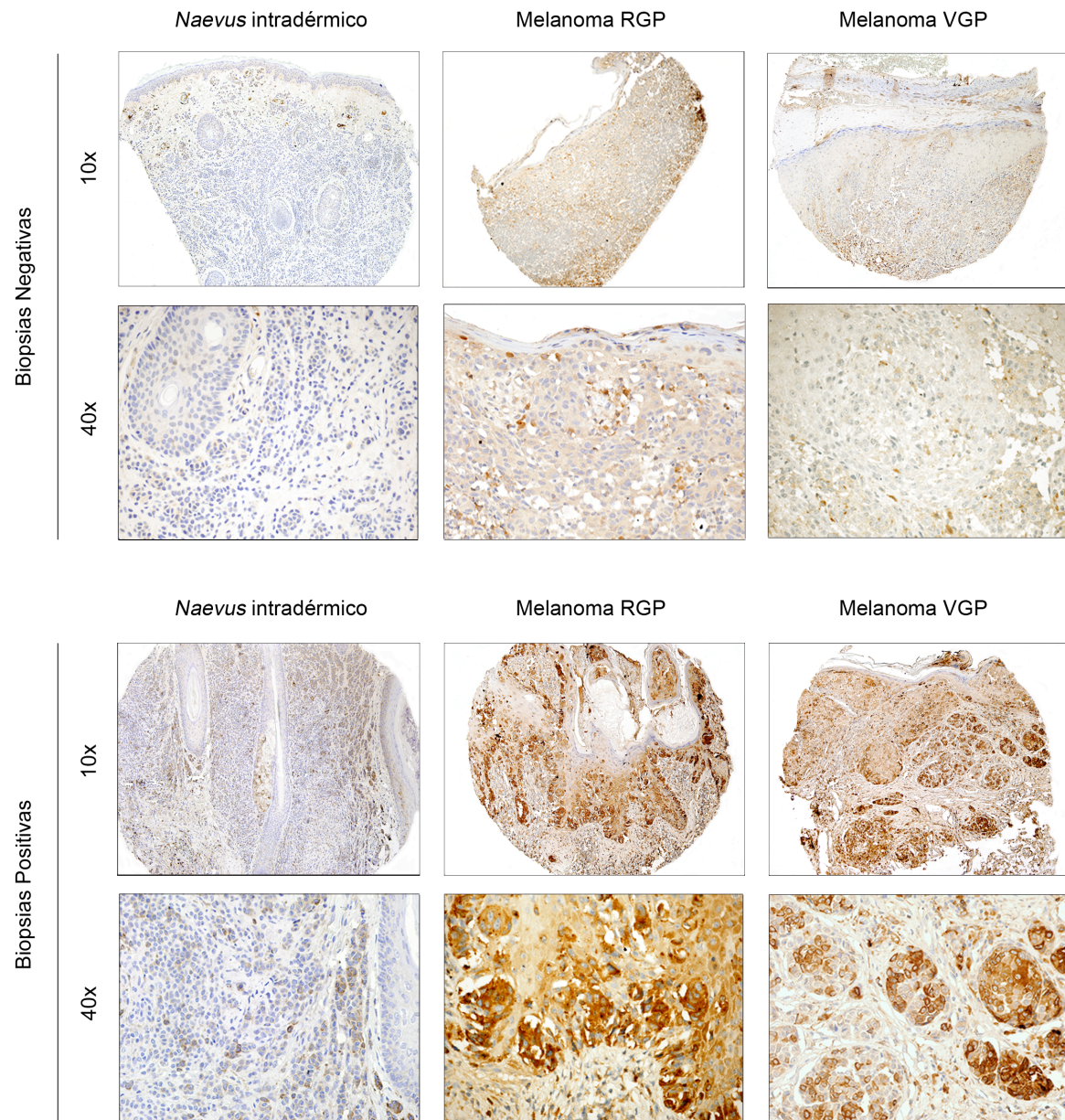
Comprobamos *in situ* la especificidad del anticuerpo anti-PEDF comercial en una biopsia de melanoma RGP donde la inmunohistoquímica dio como resultado una señal citoplásmica con núcleos excluidos. Además de detectar señal positiva para PEDF en las células de melanoma (asterisco en blanco), observamos que los queratinocitos que componen los diferentes estratos de la epidermis son negativos para PEDF (asterisco en negro); corroborando así los datos obtenidos por *Western blot* y RT-PCR cuantitativa en un trabajo previo del laboratorio utilizando cultivos primarios de melanocitos y queratinocitos purificados de la piel humana (Orgaz *et al.*, 2009) (Figura 7).



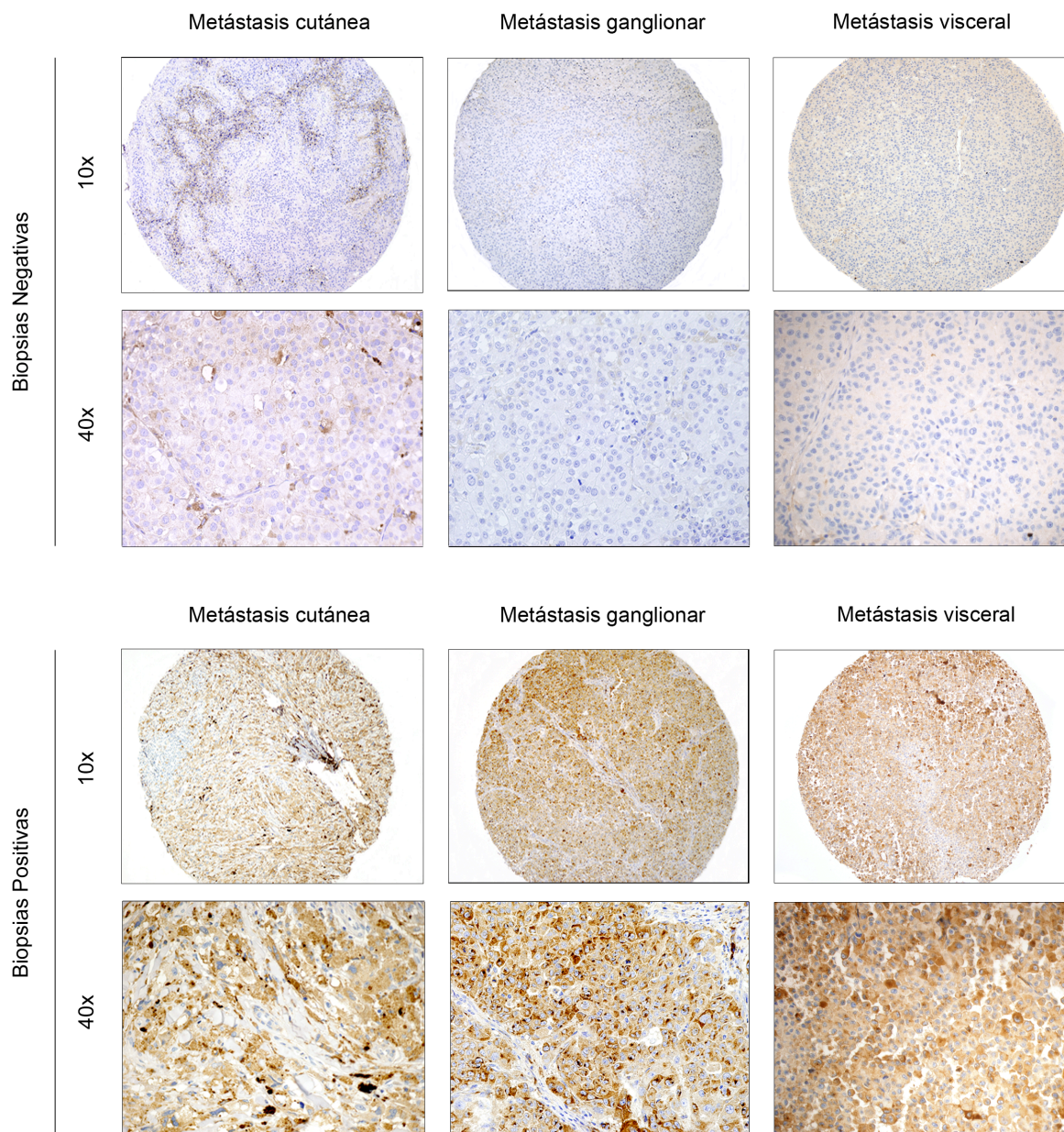
**Figura 7. Control de expresión de PEDF.** Se muestra la detección de PEDF mediante inmunohistoquímica en un caso de melanoma en fase de crecimiento radial (RGP). El asterisco en negro señala los queratinocitos negativos para PEDF que forman parte de la epidermis (flecha), mientras que el asterisco en blanco muestra la señal positiva para PEDF en las células de melanoma. Se muestra una zona representativa (40x aumentos) de la sección completa (10x aumentos).

Observamos también que la intensidad de la señal en *naevi* intradérmicos es mucho más débil que en cualquiera de los demás estadios del melanoma, y que en estas lesiones benignas, PEDF no está presente de forma homogénea en todas las células del melanoma, sino que presenta cierta heterogeneidad de expresión. A su vez, tanto en melanomas primarios (RGP y VGP) como en metástasis (cutánea, ganglionar y visceral) vimos que no todas las células del tumor mostraban señal para PEDF, y que además, aquellas que presentaban marcaje para PEDF, la intensidad de la señal presentaba también cierta variabilidad (Figura 8).









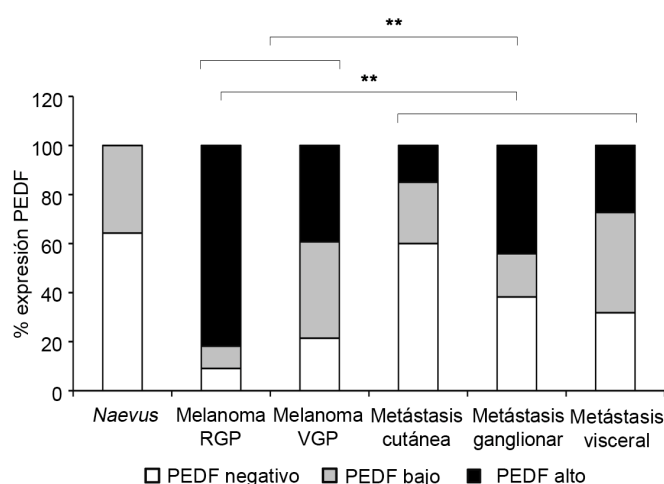
**Figura 8. Expresión de PEDF en los TMA de *naevus* y melanoma.** Se muestra la detección mediante inmunohistoquímica de PEDF en seis colecciones de TMA correspondientes a *naevus* intradérmico, melanoma primario en fase de crecimiento radial (RGP), melanoma primario en fase de crecimiento vertical (VGP) (página anterior), metástasis cutánea, metástasis ganglionar y metástasis visceral (página actual). De cada uno de los TMA se muestra un caso de expresión negativa y positiva para PEDF tanto de la sección completa (10x aumentos) como de una zona representativa (40x aumentos).

La evaluación de los TMA se llevó a cabo mediante un criterio cualitativo, basado en la intensidad de la señal y el porcentaje de células marcadas, de tal forma que las muestras fueron clasificadas en tres grupos: 0 - PEDF negativo (no expresión), 1 - PEDF bajo (menos del 50% de

células con tinción de alta intensidad) y 2 - PEDF alto (más del 50% de células con tinción de alta intensidad) (Tabla 8).

**Tabla 8. Cuantificación de la expresión de PEDF en los diferentes TMA**

Lesión	PEDF negativo (0)	PEDF bajo (1)	PEDF alto (2)	Porcentajes	
				PEDF total (bajo y alto)	PEDF alto
<b>Naevus intradérmico</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>35,7 %</b>	<b>0 %</b>
Melanoma radial (RGP)	1	1	9	90,9 %	81,8 %
Melanoma vertical (VGP)	6	11	11	78,6 %	39,3 %
<b>Melanoma primario</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>82 %</b>	<b>51,3 %</b>
Metástasis cutánea	24	10	6	31 %	15 %
Metástasis ganglionar	13	6	15	64 %	44,1 %
Metástasis visceral	7	9	6	68,2 %	27,3 %
<b>Metástasis</b>	<b>44</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>54,2 %</b>	<b>28,1 %</b>



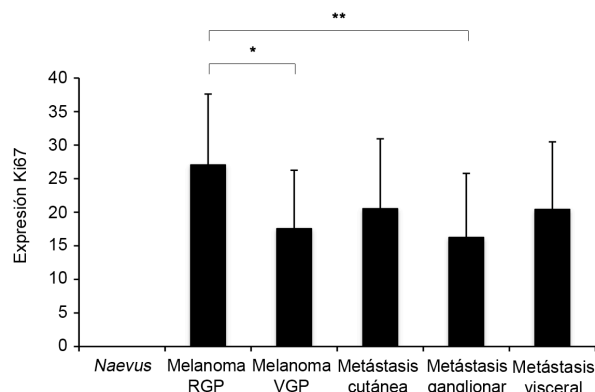
**Figura 9. La expresión de PEDF disminuye durante la progresión maligna del melanoma.** Representación gráfica del porcentaje de biopsias de los diferentes TMA clasificadas según la expresión de PEDF. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) (\*\*,  $P<0,01$ ).

De acuerdo al *score* utilizado para clasificar los TMA, observamos que el mayor número de biopsias altamente positivas para PEDF se encuentra dentro del grupo de melanomas primarios (51,3%) (Tabla 8). Sin embargo, si centramos nuestra atención dentro de este grupo, detectamos un notable descenso aunque no significativo en el número de biopsias altamente positivas para PEDF en los melanomas VGP (39,3%) con respecto a los melanomas RGP (81,8%) (Tabla 8 y Figura 9). La adquisición de características invasivas y metastásicas durante la transición de melanoma RGP a VGP podría explicar este descenso en los niveles de expresión de PEDF. Asimismo también encontramos un descenso, aunque esta vez significativo, en la expresión de PEDF en el grupo de las metástasis (28,1%) al compararlo tanto con el melanoma RGP (81,8%) (\*\*,  $P<0,01$ ) como con el conjunto de melanomas primarios (melanoma RGP y VGP) (51,3%) (\*\*,  $P<0,01$ ) (Tabla 8 y Figura 9).

Por otra parte, también se realizaron inmunohistoquímicas de los marcadores de proliferación celular Ki67 (positivo para células en proliferación) y p16<sup>INK4A</sup> (supresor tumoral implicado en parada de ciclo celular) (Alonso *et al.*, 2004). Como esperábamos, los melanomas RGP son los que muestran mayor tasa proliferativa, observando un descenso significativo (teniendo en cuenta la gran heterogeneidad característica de este cáncer) en los melanomas VGP (\*,  $P<0,05$ ) (Figura 10) donde las

## Resultados

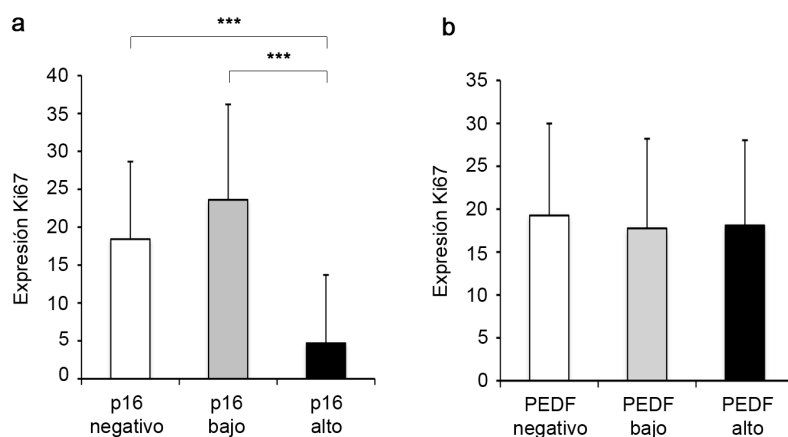
células comienzan a invadir la dermis y adquieren capacidad metastásica (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Sin embargo, dentro de las metástasis, aunque la señal de Ki67 es menor que la observada en los melanomas RGP, únicamente detectamos un descenso significativo en las metástasis ganglionares (\*\*,  $P<0,01$ ) (Figura 10).



**Figura 10. Expresión de Ki67 en los TMA de naevus y melanoma.** Cuantificación de la señal de Ki67 en inmunohistoquímicas realizadas en los TMA de naevus intradérmico, melanoma primario y metástasis. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*,  $P<0,05$ ; \*\*,  $P<0,01$ ).

Como esperábamos, al clasificar las biopsias según sus niveles de  $p16^{\text{INK4A}}$  y cuantificar la señal de Ki67 en cada uno de los grupos, observamos que existía una correlación inversa entre  $p16^{\text{INK4A}}$  y Ki67, de tal forma que aquellas biopsias donde detectábamos alta expresión de  $p16^{\text{INK4A}}$ , muy pocas muestras mostraban señal para Ki67 (Figura 11a). Las diferencias significativas observadas al comparar los grupos entre sí (\*\*\*,  $P<0,001$ ) demuestran *in vivo* la asociación inversa entre ambos marcadores.

A continuación analizamos si existía una correlación entre los niveles de expresión de PEDF y la proliferación de las biopsias de melanoma analizadas (Figura 11b). Al ordenar las lesiones según su expresión de PEDF no observamos diferencias significativas entre los grupos al cuantificar la señal de Ki67 en cada uno de ellos (Figura 11b). Este resultado parece indicar que en las muestras de melanoma y metástasis analizadas no existe una correlación directa entre el grado de proliferación y la expresión de PEDF. Sin embargo, en los naevi sí que observamos una correlación entre PEDF y proliferación (Ki67) (ver apartado 1.2.).

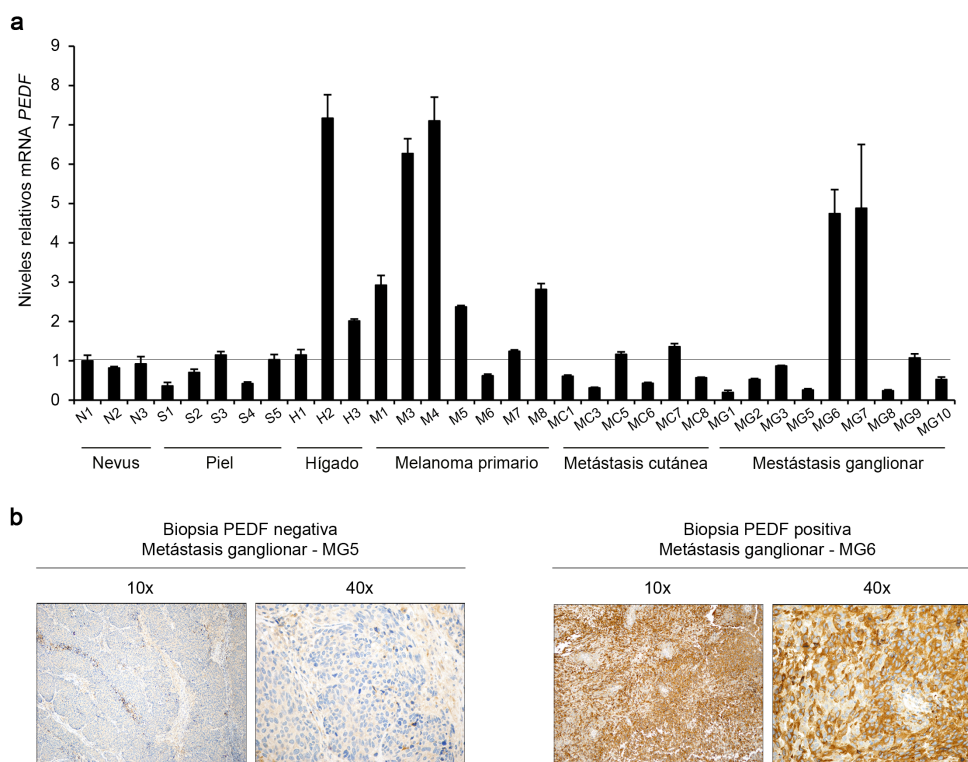


**Figura 11. Cuantificación de Ki67 en biopsias clasificadas según sus niveles de expresión de  $p16^{\text{INK4A}}$  y PEDF.** Se clasificaron las biopsias según sus niveles de expresión de (a)  $p16^{\text{INK4A}}$  ó (b) PEDF y se cuantificó la señal de Ki67 en cada uno de los grupos. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*\*,  $P<0,001$ ).



La ausencia de asociación entre PEDF y proliferación en biopsias de melanoma primario y metástasis parece corroborar los resultados previos obtenidos en líneas de melanoma poco agresivas (alta expresión de PEDF) que mostraban un aumento en su capacidad migratoria, invasiva y potencial metastásico al silenciar PEDF, sin apenas afectación de su capacidad proliferativa (Orgaz *et al.*, 2009). Estos resultados mostraban una correlación entre pérdida de expresión de PEDF y aumento de agresividad (Orgaz *et al.*, 2009). Aunque el grupo de JL. Rodríguez-Peralto y colaboradores (Alonso *et al.*, 2007) ya describió el aumento de marcadores de invasión y de transición epitelio-mesénquima (EMT) como N-cadherina (Li *et al.*, 2001), osteonectina (SPARC) (Ledda *et al.*, 1997) y osteopontina (Smit *et al.*, 2007) en muestras de melanoma VGP que metastatizaban, sería interesante poder determinar la posible correlación entre la expresión de PEDF y marcadores de agresividad/invasividad en el conjunto de biopsias de melanoma analizadas en nuestro trabajo.

Además de analizar los niveles de proteína de PEDF, también realizamos RT-PCR cuantitativa de biopsias humanas congeladas para determinar su expresión a nivel de mRNA. Como control positivo llevamos también muestras de hígado y de piel (Tombran-Tink *et al.*, 1996) (Figura 12a). Además, como control de la especificidad de la técnica verificamos el resultado de la RT-PCR cuantitativa mediante inmunohistoquímica en dos de las biopsias utilizadas: una negativa (MG5) y otra positiva (MG6) (Figura 12b).



**Figura 12. Los niveles de mRNA de PEDF disminuyen durante la progresión maligna del melanoma.** (a) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de PEDF en muestras humanas congeladas de *naevus* (N), piel (S), hígado (H), melanoma primario (M), metástasis cutánea (MC) y metástasis ganglionar (MG). Se muestran los niveles de mRNA de PEDF relativos a los del *naevus* 1 (N1) tras la normalización con los niveles de *18s rRNA*. Las barras representan media  $\pm$  DE. (b) Inmunohistoquímica de PEDF en biopsias de metástasis ganglionar (MG5 y MG6). Los paneles muestran una zona representativa (40x aumentos) de la sección (10x aumentos).

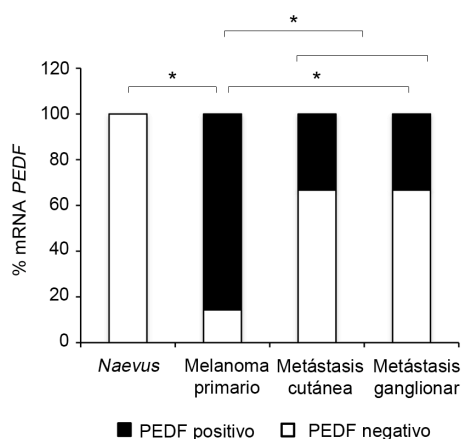
## Resultados

Al igual que en la inmunohistoquímica de los TMA, observamos que el mayor número de casos positivos para PEDF se encuentran en melanomas primarios (85,7%) y que su expresión disminuye en metástasis (Tabla 9); siendo estadísticamente significativo el descenso observado en los niveles de mRNA de *PEDF* tanto en metástasis ganglionares (33,3 %) (\*,  $P<0,05$ ) como en el grupo formado por metástasis cutáneas más ganglionares (66,6%) (\*,  $P<0,05$ ) al compararlo con el melanoma primario (85,7%) (Tabla 9 y Figura 13). Aunque las metástasis cutáneas muestran el mismo porcentaje de expresión de PEDF que las metástasis ganglionares (33,3%) (Tabla 9), el tamaño muestral impide detectar diferencias significativas con respecto al melanoma primario (Figura 13).

A su vez, también observamos la ausencia de señal para el mRNA de *PEDF* en todas las biopsias de *naevus* intradérmico analizadas. Aunque la diferencia en los niveles de mRNA de *PEDF* entre *naevus* y melanoma RGP resulta significativa (\*,  $P<0,01$ ) (Tabla 9 y Figura 13), dado el bajo tamaño muestral del grupo de *naevi*, haría falta un análisis con mayor número de biopsias para corroborar de forma más robusta esta significación.

**Tabla 9. Evaluación de la RT-PCR cuantitativa de PEDF en biopsias humanas**

Lesión	PEDF negativo	PEDF positivo	Porcentaje expresión PEDF
<b>Naevus intradérmico</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0 %</b>
<b>Melanoma primario</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>85,7 %</b>
Metástasis cutánea	4	2	33,3 %
Metástasis ganglionar	6	3	33,3 %
<b>Metástasis</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>66,6 %</b>



**Figura 13. El número de biopsias que presenta altos niveles de mRNA de *PEDF* es mayor en melanoma primario que en metástasis.** Representación gráfica del porcentaje de biopsias positivas y negativas para el mRNA de *PEDF*. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) (\*,  $P<0,05$ ).

Aunque estos resultados parecen corroborar en biopsias de melanoma humano (lesión primaria y metástasis) los datos previos de pérdida de expresión de PEDF durante la progresión maligna del melanoma obtenidos en líneas celulares (Orgaz *et al.*, 2009), no podemos pasar por alto la heterogeneidad encontrada en la expresión de PEDF en las biopsias. En base al modelo del *phenotype switching* (Hoek *et al.*, 2008), esta heterogeneidad de la expresión de PEDF en las biopsias podría ser consecuencia de la co-existencia de células proliferativas (alto PEDF) e invasivas (bajo PEDF) en una misma lesión, independientemente del estadio hitopatológico. Podemos sugerir que las lesiones

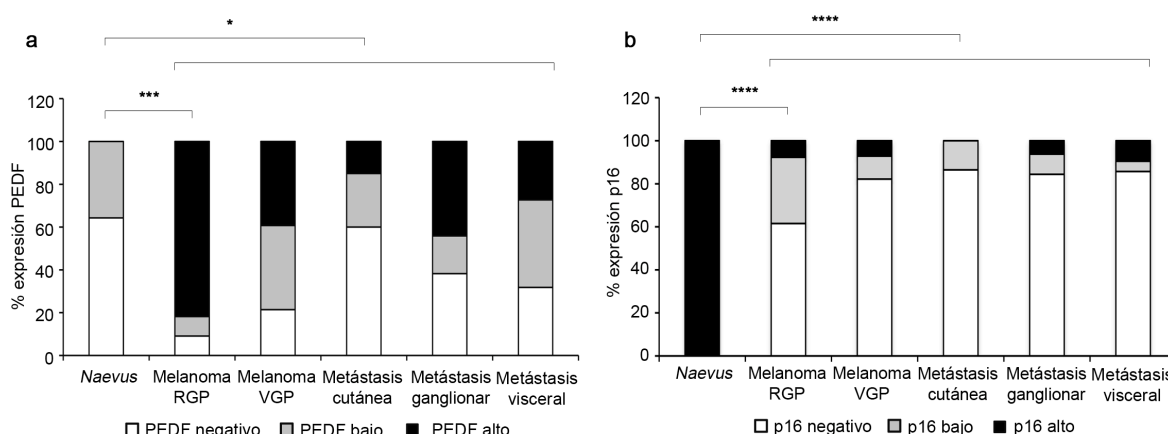
menos agresivas (melanomas RGP) estarían enriquecidas en células del perfil proliferativo, que expresan altos niveles de PEDF y viceversa, las lesiones más agresivas (melanomas VGP y metástasis) estarían enriquecidas en células del perfil invasivo que expresan bajos niveles de PEDF.

## 1.2. La expresión de PEDF disminuye en el *naevus* intradérmico

Al analizar la expresión de PEDF en biopsias humanas, tanto por inmunohistoquímica como por RT-PCR cuantitativa, uno de los datos que más nos sorprendió fue la baja expresión de PEDF en *naevi* intradérmicos.

El *naevus* es una lesión benigna formada por melanocitos que raramente progresa a melanoma. Partiendo del dato que ya conocíamos de que los melanocitos expresaban altos niveles de PEDF (Orgaz *et al.*, 2009), pensamos que el *naevus* sería un buen control positivo para chequear los niveles de PEDF en biopsias humanas. Sin embargo, el TMA reveló que únicamente un tercio de las muestras mostraba expresión de PEDF a niveles muy bajos (35,7%), y que ninguna de las biopsias podía ser clasificada dentro del valor de PEDF de expresión alta (> 50% células positivas y con alta intensidad de señal) (Tabla 8).

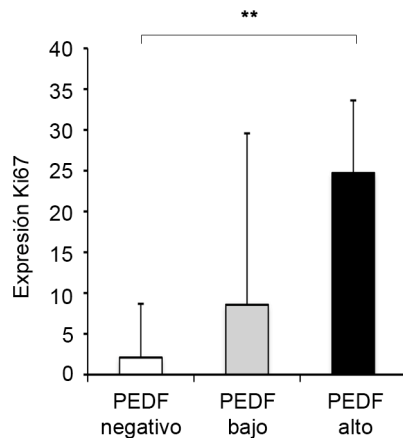
La baja expresión de PEDF que observamos en el TMA de *naevus* es estadísticamente significativa no sólo cuando la comparamos con la expresión de PEDF en el resto de las lesiones (melanoma primario y metástasis) (\*,  $P < 0,05$ ), sino también con el melanoma RGP (\*\*\*,  $P < 0,001$ ), donde observamos un incremento drástico en los niveles de PEDF con respecto al *naevus* (Figura 14a). El resultado de la inmunohistoquímica de p16<sup>INK4A</sup> como supresor tumoral implicado en ciclo celular mostró que p16<sup>INK4A</sup> se expresa en todas las biopsias de *naevus* a niveles elevados, y que su expresión se va perdiendo de forma significativa a lo largo de la progresión del melanoma (Figura 14b).



**Figura 14. Las biopsias humanas de *naevus* presentan bajos niveles de expresión de PEDF.** Representación gráfica del porcentaje de biopsias clasificadas según la expresión de (a) PEDF y (b) p16<sup>INK4A</sup> dentro de los diferentes TMA. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ).

## Resultados

En este contexto, la parada proliferativa en los *naevi* detectada mediante la nula y alta expresión de Ki67 (Figura 10) y p16<sup>INK4a</sup> (Figura 14b) respectivamente, podría estar relacionada con la pérdida de expresión de PEDF. Al comparar los niveles de expresión de PEDF en *naevi* y melanomas RGP en relación a su expresión de PEDF, comprobamos que existe una correlación directa entre Ki67 y PEDF (\*\*,  $P < 0,01$ ) (Figura 15).



**Figura 15. En biopsias de *naevus* y melanoma RGP existe una asociación positiva entre proliferación y PEDF.** Cuantificación de Ki67 en las biopsias de *naevus* y melanoma primario en fase de crecimiento radial (RGP) clasificadas según su expresión de PEDF. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*,  $P < 0,01$ ).

En resumen, las células de melanoma de las lesiones en fase radial se caracterizan por niveles altos de expresión de PEDF y su malignización conlleva la pérdida de expresión de PEDF en los estadios VGP y metástasis. Paradójicamente, encontramos una pérdida de expresión de PEDF en biopsias de *naevus* benigno. Finalmente, existe una correlación directa entre parada proliferativa y pérdida de expresión de PEDF en *naevus*.



## 2. FACTORES REGULADORES DE LA EXPRESIÓN DE PEDF EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DEL MELANOMA HUMANO

### 2.1. Senescencia

Como se ha descrito anteriormente, una de las características del *naevus* es que está formado por melanocitos que presentan parada de ciclo celular debido a un proceso de entrada en senescencia inducida por oncogenes de la vía de las MAPK, principalmente por mutaciones en *BRAF* y también en *NRAS* (Bauer *et al.*, 2007; Pollock *et al.*, 2003). Se trata por tanto de lesiones que permanecen durmientes durante décadas y raramente adquieren un fenotipo maligno dando lugar a melanomas (Bennett, 2003; Miller and Mihm, 2006).

En el apartado 1.2. observamos que las biopsias humanas de *naevus* intradérmico presentaban niveles de expresión de PEDF significativamente inferiores a los que encontramos en las biopsias de melanoma primario o metástasis. Además estos *naevi* no mostraban positividad para Ki67, resultado indicativo de ausencia de proliferación. Teniendo en cuenta este dato, junto con lo descrito en la bibliografía a cerca del carácter senescente de este tipo de lesiones, pensamos que podría existir una relación entre inducción de senescencia y pérdida de expresión de PEDF.

#### 2.1.1. En cultivos primarios de melanocitos, la inducción de senescencia por HRAS<sup>G12V</sup> regula negativamente la expresión de PEDF

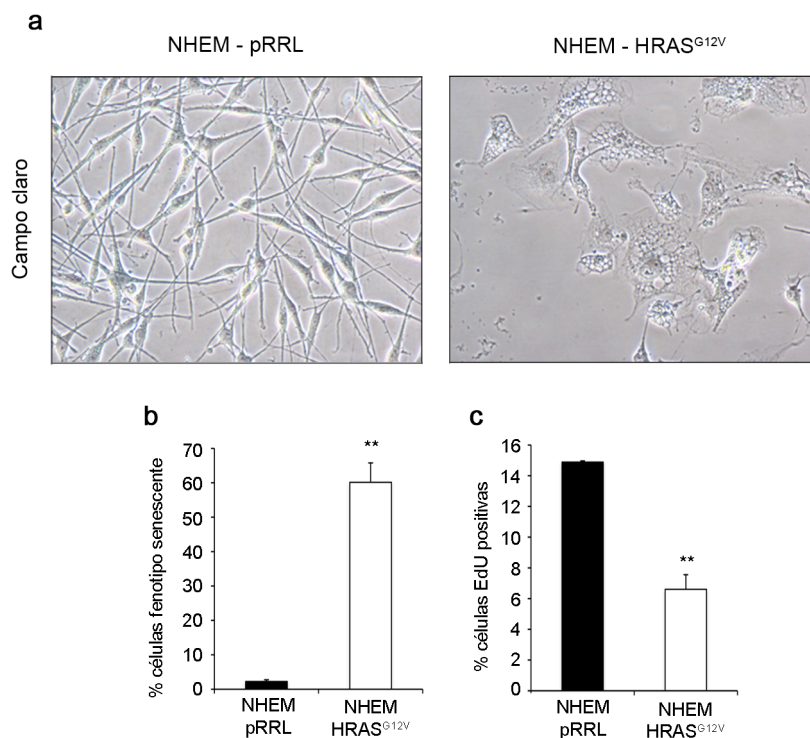
Son varios los grupos que han sido capaces de inducir senescencia en melanocitos y fibroblastos mediante sobre-expresión de BRAF<sup>V600E</sup>, NRAS<sup>Q61R</sup> ó HRAS<sup>G12V</sup> (Denoyelle *et al.*, 2006; Michaloglou *et al.*, 2005; Scurr *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2008). En el caso del *naevus* benigno, estas mutaciones en *BRAF* y *NRAS* están presentes en un 80% y 20% respectivamente, activando constitutivamente la vía de las MAPK e induciendo una proliferación masiva de los melanocitos que lo componen (Davies *et al.*, 2002; Pollock *et al.*, 2003) y su posterior entrada en senescencia como mecanismo de defensa para evitar la transformación oncogénica (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Se ha descrito que la senescencia inducida por BRAF<sup>V600E</sup> es fenotípicamente diferente a la obtenida por sobre-expresión de RAS (NRAS<sup>Q61R</sup> ó HRAS<sup>G12V</sup>) (Denoyelle *et al.*, 2006; Zhuang *et al.*, 2008). Los melanocitos infectados con la versión mutada de *BRAF*, además de necesitar una alta sobre-expresión para poder inducir senescencia, presentan pequeños cambios en su morfología que empiezan a ser detectables por los marcadores de senescencia (SA-β-Gal y condensación de cromatina) de forma tardía a partir de la tercera semana de la infección. Sin embargo, la infección con NRAS<sup>Q61R</sup> ó HRAS<sup>G12V</sup>, incluso con bajos niveles de expresión, origina un cambio tan drástico en la morfología del melanocito que es visible a los pocos días de la infección. Por este motivo, para determinar si la entrada en senescencia inducida por mutaciones en la vía de las MAPK podría estar

## Resultados

regulando negativamente a PEDF en el *naevus*, sobre-expresamos *in vitro* HRAS<sup>G12V</sup> en cultivos primarios de melanocitos mediante transducción lentiviral.

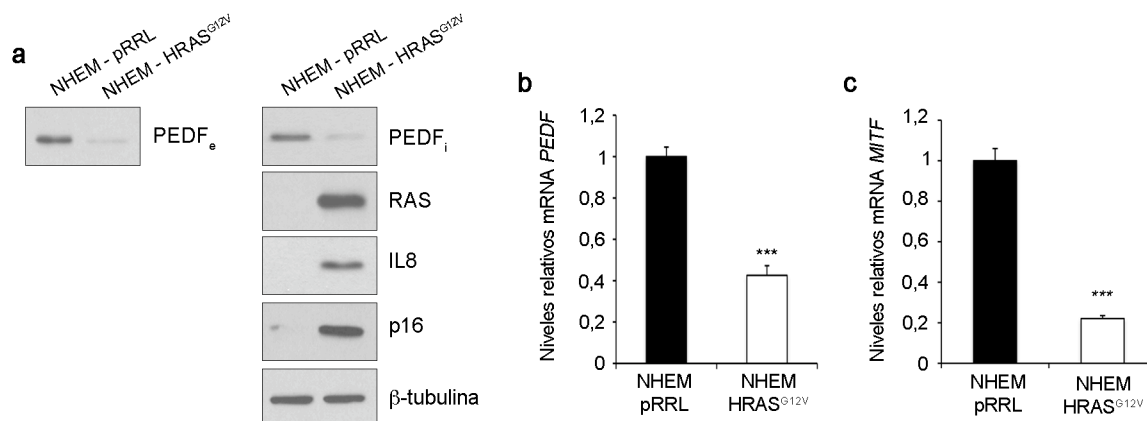
A los seis días de la infección, observamos que los melanocitos que sobre-expresan HRAS<sup>G12V</sup> (NHEM-HRAS<sup>G12V</sup>) presentaban un fenotipo característico de inducción de senescencia por HRAS, con citoplasma extendido, vacuolizado y núcleos prominentes (Figura 16a). Debido al alto grado de vacuolización de las células NHEM-HRAS<sup>G12V</sup>, apenas pudimos detectar tinción  $\beta$ -galactosidasa (SA- $\beta$ -Gal); sin embargo realizamos la cuantificación de células con fenotipo senescente y observamos un incremento significativo en los melanocitos NHEM-HRAS<sup>G12V</sup> con respecto a los melanocitos control (NHEM-pRRL) (Figura 16b); además de comprobar también la parada proliferativa propia del arresto celular (Figura 16c).



**Figura 16. La sobre-expresión de HRAS<sup>G12V</sup> en melanocitos induce la adquisición de un fenotipo senescente y la parada proliferativa de las células.** (a) Imágenes de campo claro (20x aumentos) de los melanocitos primarios NHEM-pRRL y NHEM-HRAS<sup>G12V</sup>. (b) Cuantificación del número de células con fenotipo senescente. Se contaron 20 campos por condición. (c) Ensayo de proliferación mediante incorporación de 5-etinil-2-deoxiuridina (EdU) en los melanocitos primarios NHEM-pRRL y NHEM-HRAS<sup>G12V</sup>. Se crecieron las células durante 6 h en presencia de 20  $\mu$ M EdU. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de Student (\*\*, *P*<0,01).

Al analizar la expresión de PEDF por *Western blot* observamos que los melanocitos NHEM-HRAS<sup>G12V</sup> presentaban un descenso en sus niveles de proteína tanto extracelular (PEDF<sub>e</sub>) como intracelular (PEDF<sub>i</sub>) (Figura 17a), así como de sus niveles de mRNA de *PEDF* (Figura 17b). Observamos también en los melanocitos NHEM-HRAS<sup>G12V</sup> un incremento en la expresión de p16<sup>INK4A</sup> e IL8 propio de la entrada en senescencia (Bansal and Nikiforov, 2010; Kuilman *et al.*, 2008) (Figura

17a). Por último, no sólo detectamos un descenso en los niveles de mRNA de *PEDF* sino también en el mRNA de *MITF* (Figura 17c). Este descenso en los niveles de mRNA de *MITF* coincide con datos publicados por otros grupos donde se describe el descenso de MITF a nivel de proteína en melanocitos senescentes (Schwahn *et al.*, 2005) y la entrada en senescencia inducida por la interferencia de MITF en células de melanoma (Giuliano *et al.*, 2010).



**Figura 17. La inducción de senescencia en melanocitos por HRAS<sup>G12V</sup> produce una reducción de los niveles de PEDF y MITF.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en medio condicionado (MC), PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>), RAS, IL8 y p16<sup>INK4A</sup> en extractos totales de proteína de los cultivos primarios de melanocitos NHEM-pRRL y NHEM-HRAS<sup>G12V</sup>. Se usó β-tubulina como control de carga. (b-c) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de (b) *PEDF* (c) y *MITF* en los cultivos primarios de melanocitos NHEM-pRRL y NHEM-HRAS<sup>G12V</sup>. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* relativos a los de los melanocitos control NHEM-pRRL tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan media ± DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de Student (\*\*\*, *P*<0,001).

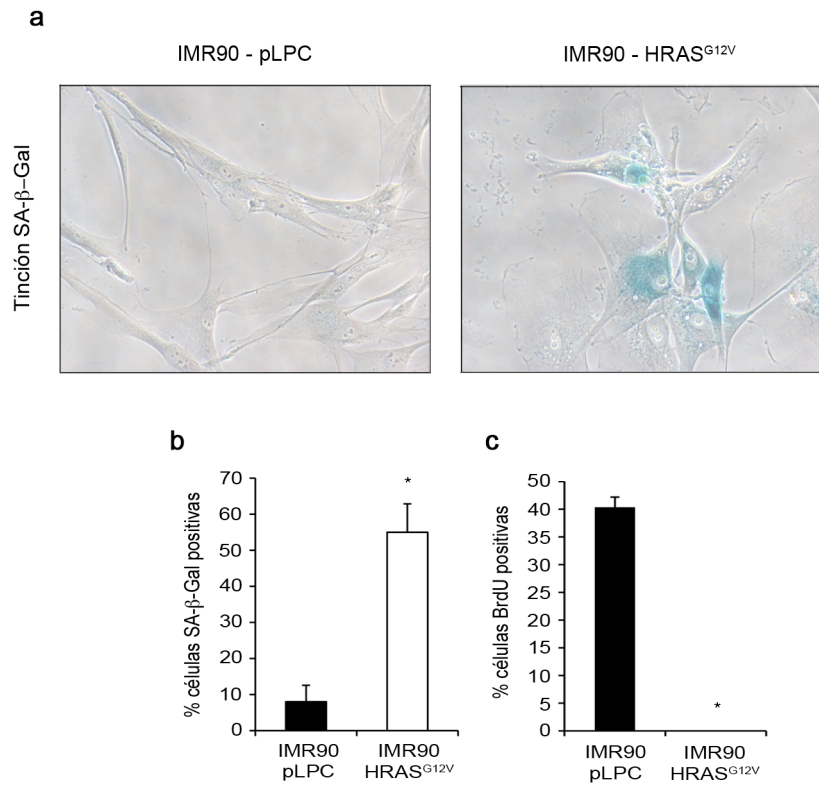
### 2.1.2. La inducción de senescencia por HRAS<sup>G12V</sup> en fibroblastos inmortalizados regula negativamente los niveles PEDF

Demostrada la regulación negativa de PEDF por senescencia en melanocitos, quisimos comprobar si se trataba de un proceso restringido a este tipo celular o por el contrario, de un mecanismo que pudiera ser aplicable a otros tipos celulares.

Los fibroblastos presentes en la dermis también presentan altos niveles de PEDF aunque menores que melanocitos (Orgaz *et al.*, 2009). Por otra parte, los fibroblastos son el modelo más utilizado para la identificación del mecanismo implicado en la inducción de senescencia por oncogenes de la vía RAS/RAF (Lin *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos sobre-expresar HRAS<sup>G12V</sup> en fibroblastos IMR90 mediante transducción retroviral. A los nueve días de la infección observamos que los fibroblastos IMR90-HRAS<sup>G12V</sup> adquirían también un fenotipo senescente, con características similares a las presentadas por los

## Resultados

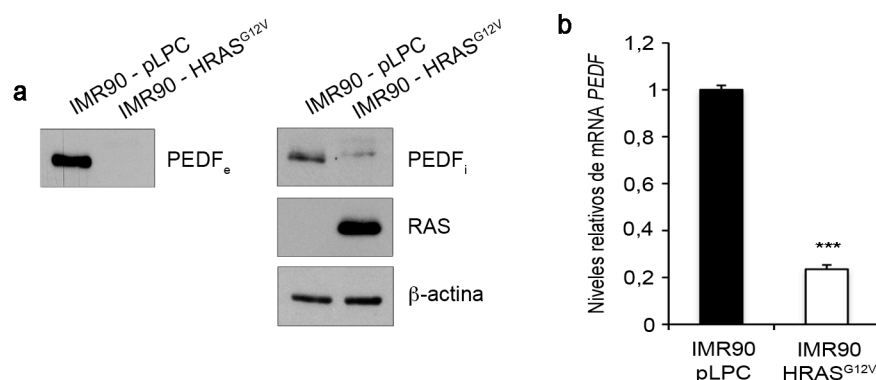
melanocitos NHEM-HRAS<sup>G12V</sup>, que confirmamos por el incremento significativo de células positivas para la tinción de SA-β-Gal, que tiñe las células senescentes en azul (Figura 18a-b). También observamos una parada proliferativa de los fibroblastos IMR90-HRAS<sup>G12V</sup> con respecto a los fibroblastos control IMR90-pLPC (Figura 18c).



**Figura 18. La sobre-expresión de HRAS<sup>G12V</sup> en fibroblastos IMR90 promueve su entrada en senescencia.** (a) Imágenes de campo claro (20x aumentos) de la tinción de β-Galactosidasa (SA-β-Gal) de los fibroblastos IMR90-pLPC e IMR90-HRAS<sup>G12V</sup>. (b) Cuantificación de las células positivas para la tinción SA-β-Gal. (c) Ensayo de proliferación mediante incorporación de 5-bromo-2'-desoxyuridina (BrdU) en los fibroblastos IMR90-pLPC y IMR90-HRAS<sup>G12V</sup>. Las células crecieron 4 h en presencia de 10 μM BrdU. Las barras representan media ± DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de Student (\*, *P*<0,05).

Al igual que en melanocitos, la senescencia inducida por la sobre-expresión de HRAS<sup>G12V</sup> en fibroblastos inmortalizados produce una disminución de PEDF tanto a nivel de proteína como de mRNA (Figura 19a-b).

Considerando en conjunto estos resultados podemos considerar que la regulación negativa de PEDF por parte de la senescencia inducida por oncogenes en melanocitos, podría considerarse como una de las causas de la ausencia o baja expresión de PEDF en biopsias humanas de *naevus*.

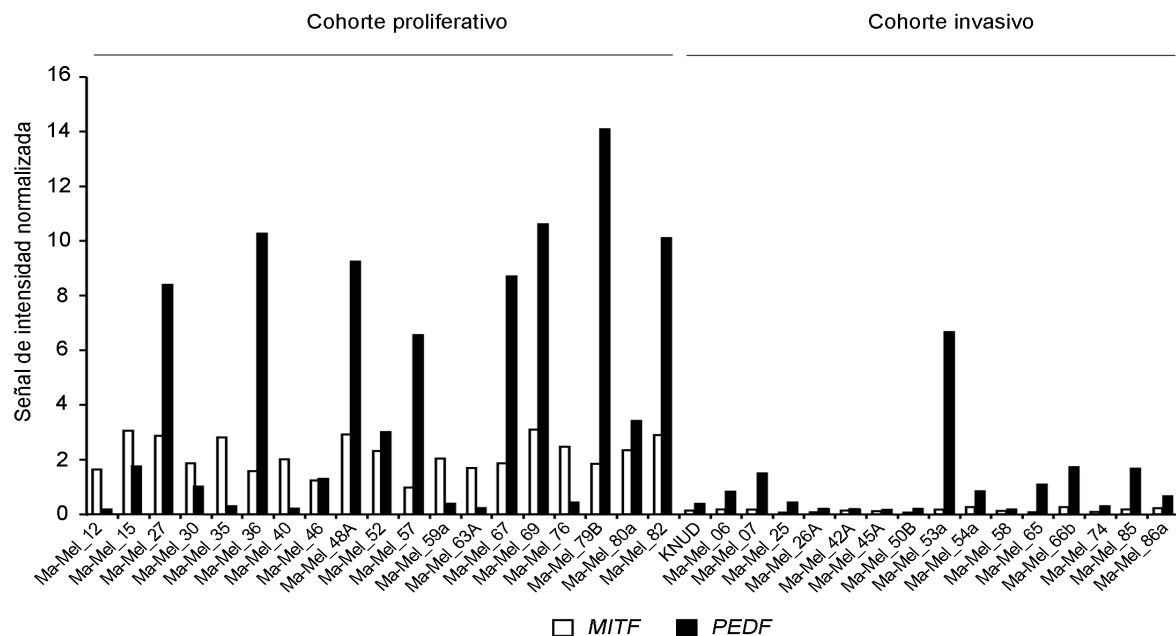


**Figura 19. La inducción de senescencia en fibroblastos IMR90 por HRAS<sup>G12V</sup> produce una reducción de los niveles de PEDF.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en medio condicionado (MC), PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) y RAS en extractos totales de proteína de los fibroblastos IMR90-pLPC y IMR90-HRAS<sup>G12V</sup>. Se usó β-actina como control de carga. (b) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en los fibroblastos IMR90-pLPC y IMR90-HRAS<sup>G12V</sup>. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de los fibroblastos control IMR90-pLPC tras la normalización con los niveles de *18s rRNA*. Las barras representan media ± DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de Student (\*\*\*, *P*<0,001).

## 2.2. MITF

MITF es un factor clave en la regulación de la biología del melanocito, ya que regula no sólo la pigmentación sino que también interviene en el control de los procesos de diferenciación, proliferación y supervivencia (Carreira *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2006). Además, MITF también está presente en las células del melanoma donde juega un papel fundamental en la regulación de la proliferación, supervivencia celular e invasividad (Levy *et al.*, 2006); procesos que están determinados en gran medida por los niveles de expresión de este factor de transcripción (Carreira *et al.*, 2006; Hoek and Goding, 2010; Levy *et al.*, 2006).

El modelo del reostato propuesto por el grupo de C. Goding y colaboradores sugiere que las células de melanoma pueden presentar diferentes fenotipos dentro del tumor (diferenciadas, proliferativas, invasivas ó senescentes) dependiendo de los niveles de expresión de MITF dentro de la célula (Carreira *et al.*, 2006; Hoek and Goding, 2010; Strub *et al.*, 2011). Este modelo, apoyaría los datos del modelo del *phenotype switching* de K. Hoek y colaboradores donde se identifican firmas de expresión molecular que diferencian a las células de melanoma en cohortes proliferativo e invasivo (Hoek *et al.*, 2006), siendo la expresión de MITF una característica central del cohorte proliferativo, con expresión baja o indetectable en el cohorte invasivo (Figura 20). Datos previos del laboratorio demostraron también que la expresión de PEDF era más elevada en las líneas celulares de melanoma caracterizadas dentro del cohorte proliferativo (Orgaz *et al.*, 2009), correlacionando de forma directa la expresión de *PEDF* y *MITF* en ambos cohortes (Figura 20).



**Figura 20. Diferencias en la expresión de *MITF* y *PEDF* entre los cohortes proliferativo e invasivo de la serie Mannheim de líneas celulares de melanoma.** Datos de expresión génica de *MITF* y *PEDF* de microarrays de la serie de Mannheim de líneas celulares de melanoma. Las líneas celulares fueron clasificadas por su perfil de expresión génica en los cohortes proliferativo e invasivo. Se presenta la señal de intensidad normalizada de *MITF* (barras blancas) y *PEDF* (barras negras) de cada serie.

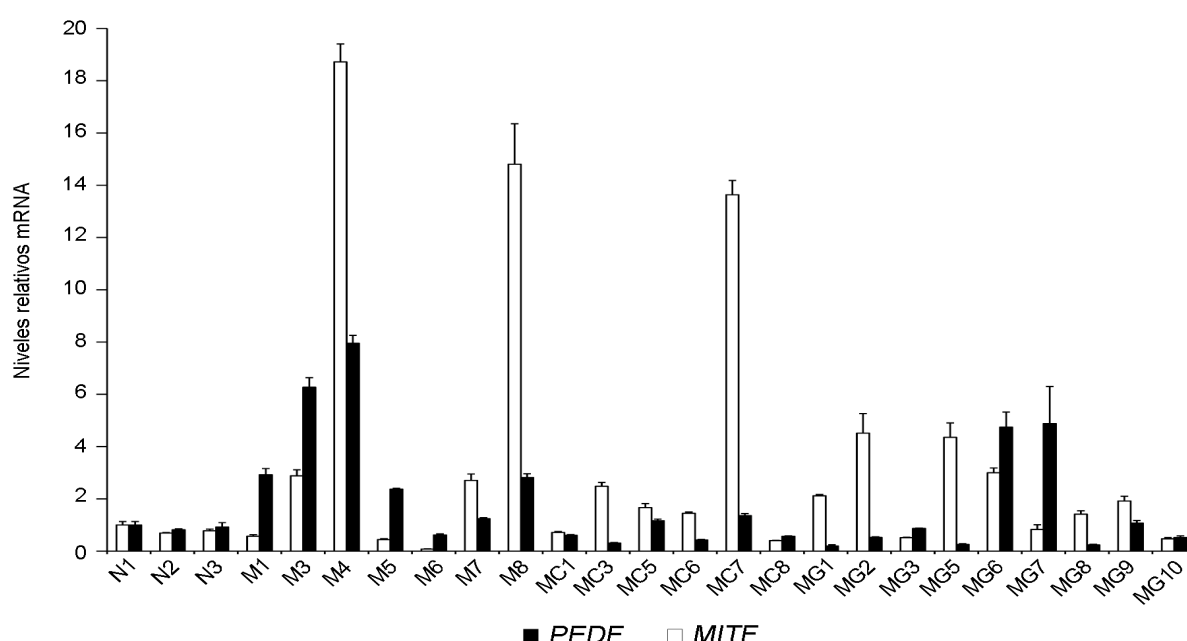
En resultados mostrados anteriormente (ver apartado 2.1.) observamos una regulación negativa de los niveles de proteína y mRNA de *PEDF* por sobre-expresión de  $HRAS^{G12V}$  en melanocitos y fibroblastos, que en el caso de los melanocitos va acompañada también por una bajada en el mRNA de *MITF*. Diversos trabajos previos describen la ausencia de expresión de *MITF* en melanocitos senescentes (Giuliano *et al.*, 2010; Schwahn *et al.*, 2005) y en un contexto más fisiológico al comparar *naevus* benigno con melanoma primario y metástasis (Carreira *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que *PEDF* y *MITF* presentan el mismo patrón de expresión en las líneas celulares de melanoma (alta expresión en células con perfil proliferativo y bajos niveles en aquellas con características invasivas) y muestran un descenso de expresión en melanocitos senescentes, nos preguntamos si *MITF*, al ser un factor clave en la regulación del melanocito y de las células de melanoma, podría estar regulando a *PEDF* durante la progresión maligna del melanoma.

### 2.2.1. En biopsias humanas de melanoma observamos una correlación positiva entre la expresión de *MITF* y *PEDF*

De la misma forma que determinamos los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* en líneas de melanoma clasificadas de acuerdo a su huella molecular (Figura 20), quisimos comprobar si existía algún tipo de correlación en la expresión de estos factores en biopsias humanas.

Para ello, realizamos RT-PCR cuantitativa para mirar los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* en las mismas biopsias de *naevus*, melanoma primario y metástasis (cutánea y ganglionar) utilizadas previamente en el apartado 1.1. (Figura 12a). De forma cualitativa lo que se observa es una tendencia a una correlación en la señal de ambos factores en varias muestras (*naevi*, M4, M8, MC1, MC5, MG6 y MG9 entre otros), sin embargo también encontramos muestras en las que no observamos dicha asociación, (por ejemplo en las muestras M1, M5, MC3, MG2, MG5) (Figura 21). Al analizar estadísticamente los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* comprobamos que la correlación observada es estadísticamente significativa (coeficiente de *Pearson*  $r = 0,4863$ ) aunque de tipo moderada según la clasificación de Higgins.



**Figura 21. Expresión de *PEDF* y *MITF* en biopsias humanas de *naevus* y melanoma humano.** Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* en muestras humanas congeladas de *naevus* (N), melanoma primario (M), metástasis cutánea (MC) y metástasis ganglionar (MG). Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* relativos a los del *naevus* 1 (N1) tras la normalización con los niveles de *18s rRNA*. Las barras representan media  $\pm$  DE.

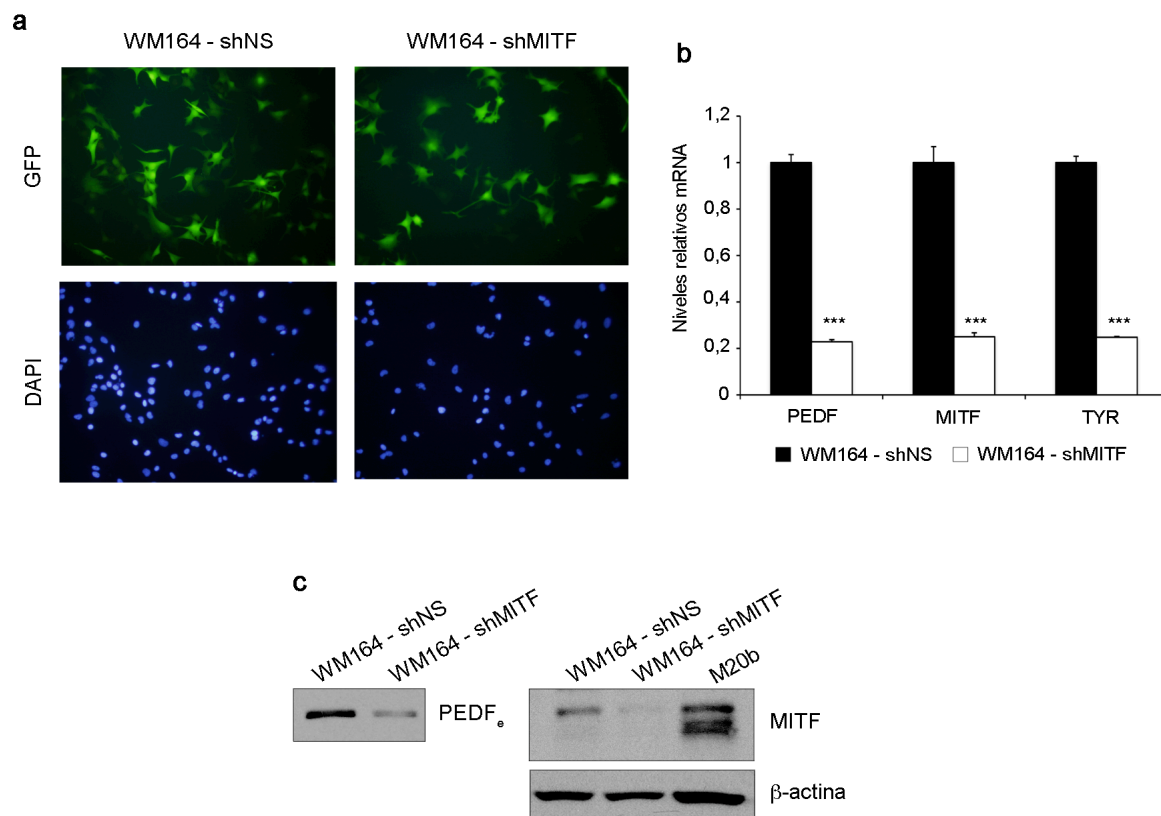
### 2.2.2. En líneas de melanoma, MITF regula a PEDF a nivel de mRNA y proteína

Para determinar de forma directa si MITF podría ser un regulador de PEDF, interferimos la expresión de MITF mediante transducción lentiviral en líneas de melanoma poco agresivas que presentaban niveles altos de expresión de PEDF. En primer lugar, silenciamos la expresión de MITF en la línea de melanoma WM164 (metástasis poco agresiva), donde tras obtener una eficiencia de transducción cercana al 100% (Figura 22a) comprobamos la bajada de mRNA de *MITF* mediante RT-



## Resultados

PCR cuantitativa (interferencia del 75%) (Figura 22b). Como esperábamos, el silenciamiento de MITF supuso una bajada en los niveles del mRNA de *TYR* (tirosinasa), que es uno de los genes diana implicados en pigmentación regulado de forma transcripcional directa por MITF (Figura 22b). Del mismo modo, también detectamos una bajada en el mRNA de *PEDF* (Figura 22b). Mediante *Western blot* comprobamos que la línea silenciada para MITF (WM164-shMITF) presentaba un descenso en sus niveles de proteína no sólo de MITF sino también de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) con respecto a la línea control (WM164-shNS) (Figura 22c).

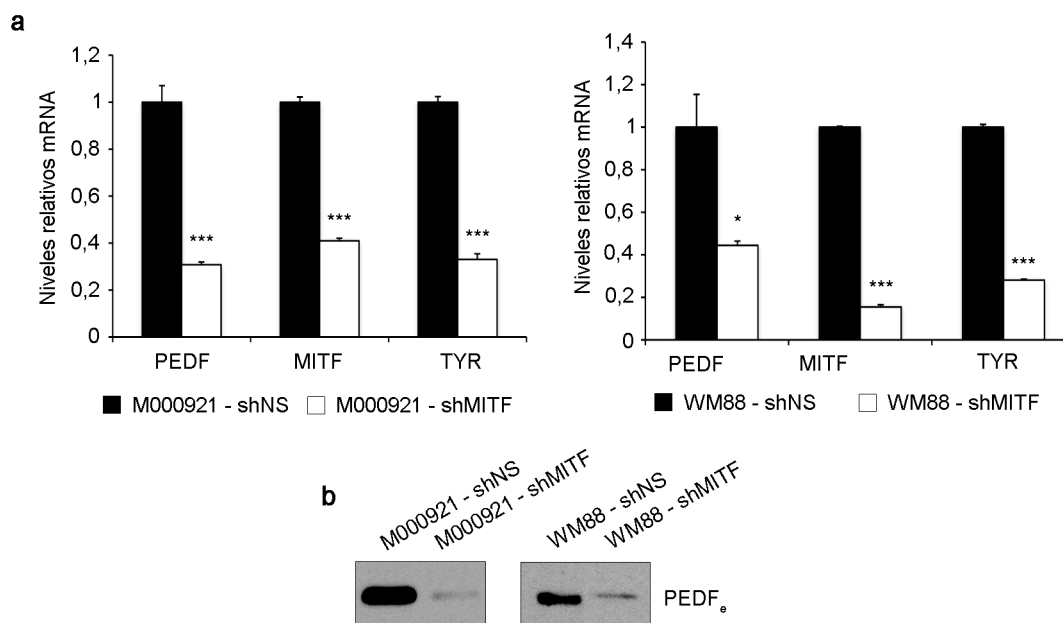


**Figura 22. El silenciamiento de MITF en la línea de melanoma WM164 disminuye los niveles de PEDF a nivel de proteína y mRNA.** (a) Eficiencia de transducción de la línea de melanoma WM164 tras la infección con lentivirus no interferente (shNS) o interferente para MITF (shMITF) a una multiplicidad de infección (MOI) de 80. Las imágenes de fluorescencia muestran que más del 95% de las células son GFP positivas. Los núcleos celulares se muestran mediante tinción con DAPI (20x aumentos). (b) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF*, *MITF* y *TYR* en las líneas de melanoma WM164-shNS y WM164-shMITF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF*, *MITF* y *TYR* relativos a los de las células control shNS tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de Student (\*\*\*, *P*<0,001). (c) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y MITF en extractos totales de proteína de las líneas de melanoma WM164-shNS y WM164-shMITF y en el cultivo primario de melanocitos M20b. Se usó  $\beta$ -actina como control de carga.

Realizamos también la interferencia de MITF en las líneas de melanoma de perfil proliferativo M000921 y WM88 (ambas metástasis poco agresivas) que, al igual que la línea WM164, expresaban altos niveles de PEDF. En ambas líneas, comprobamos que el silenciamiento de MITF por transducción lentiviral (10 MOI en la línea M000921 y 20 MOI en la línea WM88) reducía los niveles



de mRNA de *MITF* (interferencia del 60% en la línea M000921 y del 85% en la línea WM88), lo que provocaba un descenso en el mRNA de *PEDF* y *TYR* (Figura 23a). Al igual que en la línea WM164, la bajada de mRNA de *PEDF* se vio acompañada también de un descenso a nivel de proteína (Figura 23b).



**Figura 23. El silenciamiento de MITF en las líneas de melanoma M000921 y WM88 disminuye los niveles de PEDF a nivel de proteína y mRNA.** (a) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF*, *MITF* y *TYR* de las líneas de melanoma M000921-shMITF y M000921-shMITF (panel izquierdo); y las líneas de melanoma WM88-shNS y WM88-shMITF (panel derecho). Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF*, *MITF* y *TYR* relativos a los de las líneas control shNS tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test de Student (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ). (b) Análisis por Western blot de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) de las líneas de melanoma M000921-shNS, M000921-shMITF, WM88-shNS y WM88-shMITF.

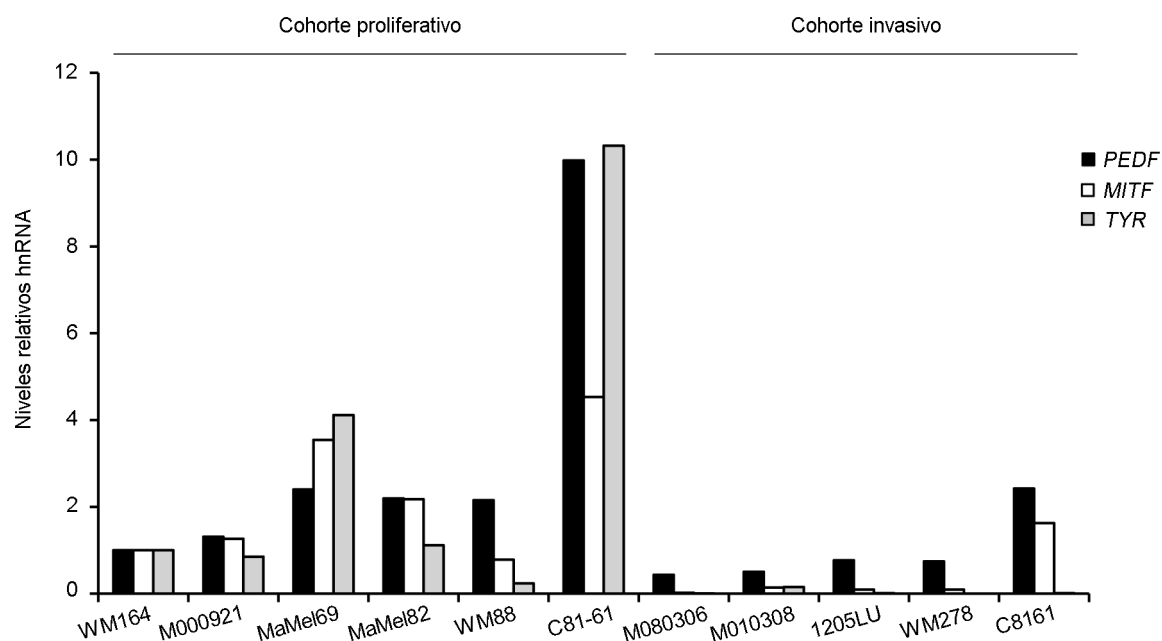
### 2.2.3. En líneas de melanoma, PEDF es regulado a nivel transcripcional por MITF

MITF regula de forma transcripcional una gran variedad de genes implicados en funciones clave de la biología del melanocito y de las células de melanoma (Cheli *et al.*, 2010). Por tal motivo, pensamos que la regulación de PEDF por MITF podría ocurrir a nivel transcripcional. Para comprobarlo, decidimos determinar los niveles de RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) de *PEDF*, *MITF* y *TYR* (control positivo regulado transcripcionalmente por MITF) en una colección de líneas de melanoma clasificadas de acuerdo a su huella molecular en cohortes proliferativo e invasivo. El hnRNA es el transcrito precursor del mRNA antes de sufrir modificaciones por *splicing*, por lo que una variación en los niveles del hnRNA de un gen supone un cambio relacionado directamente con el proceso de transcripción.

Lo que observamos es una correlación entre los niveles de hnRNA de *MITF* con *PEDF* y *TYR* en las diferentes líneas de melanoma. Con respecto a MITF, en el cohorte proliferativo observamos una

## Resultados

expresión mayor de hnRNA con respecto al cohorte invasivo (Figura 24), datos que coinciden con los niveles de mRNA de *MITF* detectados en el análisis de las líneas pertenecientes a la serie de Mannheim (Figura 20). Además, en el cohorte proliferativo observamos que la alta expresión del hnRNA de *MITF* lleva consigo altos valores tanto de hnRNA de *TYR* como de *PEDF*. Sin embargo en el cohorte invasivo, aunque la ausencia de *MITF* va acompañada de una desaparición del hnRNA de *TYR*, aún seguimos detectando señal para el hnRNA de *PEDF*, aunque en general a niveles inferiores que en el cohorte proliferativo (Figura 24). Estos niveles remanentes de expresión de *PEDF* parecen indicar que aunque haya una regulación transcripcional por parte de *MITF*, probablemente existen mecanismos post-transcripcionales de regulación de la expresión de *PEDF* en estas líneas.

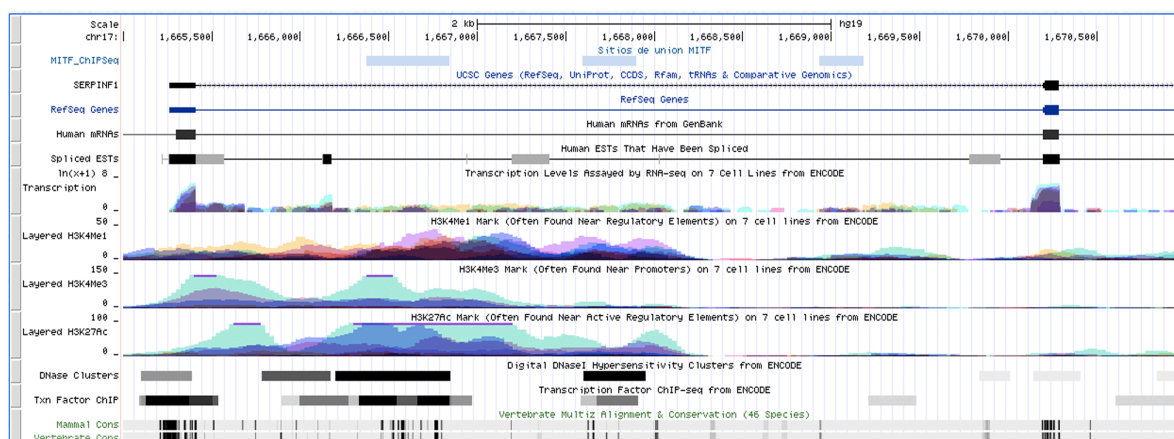


**Figura 24. Diferencias de expresión del hnRNA de *MITF*, *PEDF* y *TYR* en líneas celulares de melanoma clasificadas en cohorte proliferativo e invasivo.** Datos de expresión del hnRNA de *MITF*, *PEDF* y *TYR* en líneas de melanoma clasificadas por su perfil de expresión génica en los cohortes proliferativo e invasivo.

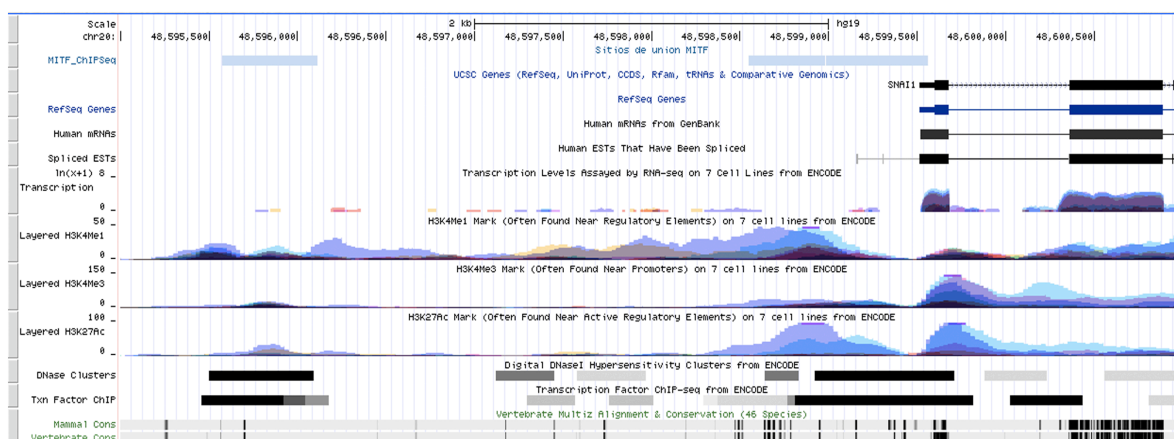
Con el objetivo de comprender mejor las funciones de *MITF* en el melanoma, el grupo de I. Davidson y colaboradores realizó una búsqueda de sitios de unión de *MITF* mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación masiva (ChIP-seq) (Strub *et al.*, 2011). A partir de los datos de libre acceso publicados por este grupo, encontramos que *SERPINF1* (símbolo correspondiente al gen de *PEDF*) presenta tres sitios de unión putativos para *MITF* dentro de su primer intrón (Figura 25a – cajas en azul). Observamos que estos sitios de unión de *MITF*, sobre todo los dos que se encuentran más próximos al extremo 5', coinciden con regiones reguladoras de la transcripción caracterizadas por: (i) la presencia de modificaciones de histonas (metilaciones y acetilaciones de la histona 3 (H3K4Me, H3K27Ac y H3K4Me3)), (ii) unión de factores de transcripción, (iii) alta conservación evolutiva e (iv) hipersensibilidad de la cromatina al corte por DNasa I (Figura 25a). Como control chequeamos también los sitios de unión de *MITF* a *SNAIL*

(símbolo del gen *SNAIL*), ya que está descrito que MITF actúa como un represor de este factor implicado en EMT (Cheli *et al.*, 2010, 2011b). En el caso de *SNAIL* detectamos también tres sitios putativos de unión de MITF en la región promotora (los dos más cercanos al extremo 5' separados únicamente por 5 pares de bases) (Figura 25b).

#### a - *SERPINF1*



#### b - *SNAIL*



**Figura 25. Localización de sitios de unión de MITF en el locus de *SERPINF1* y *SNAIL*.** Imagen obtenida a partir del soporte bioinformático *UCSC Genome Bioinformatics* (hg19) de la localización de los sitios de unión de MITF (cajas en azul) dentro del locus de (a) *SERPINF1* (símbolo del gen de *PEDF*) y (b) *SNAIL* (símbolo del gen de *SNAIL*). Los tracks *Layered H3K4Me1*, *H3K4Me3* y *H3K27Ac* corresponden a sitios de modificación de histonas. El track *Digital DNaseI Hypersensitivity Clusters* hace referencia a sitios de cromatina abierta y el track *Transcription Factor ChIP-seq* a factores de transcripción descritos para la unión en regiones del gen.

En el trabajo de I. Davidson se asignó un *score* para cada uno de los sitios de unión de MITF a los genes dianas, de tal forma que se consideró un sitio de unión significativo a aquellas regiones con un *score* mayor de 13 (valor establecido como punto de corte) (Strub *et al.*, 2011). En el caso de *SERPINF1* observamos que los tres sitios putativos de unión de MITF presentan un *score* superior a 13, valores que no difieren mucho de los asignados a los sitios de unión para *SNAIL* ó incluso para

## Resultados

*TYR*, gen diana de MITF específico del linaje melanocítico (Tabla 10), lo que parece indicar una alta afinidad de unión por parte de MITF a *SERPINF1*.

**Tabla 10. Identificación y localización de sitios de unión de MITF en *SERPINF1*, *SNAI1* y *TYR***

Identificación	Símbolo	Localización (hg19)	Distancia al inicio de la transcripción	Tamaño	Score
NM_002615	SERPINF1	17;1666374-1666842	1349	259	26
NM_002615	SERPINF1	17;1667596-1667897	2488	181	20
NM_002615	SERPINF1	17;1668933-1669182	3799	82	26
NM_005985	SNAI1	20;48595572-48596112	-3685	541	40
NM_005985	SNAI1	20;48598548-48598980	-763	433	20
NM_005985	SNAI1	20;48598985-48599562	-253	578	36
NM_000372	TYR	11;88901380-88902100	-9300	721	57
NM_000372	TYR	11;88903060-88903316	-7852	257	20
NM_000372	TYR	11;88909032-88909287	-1880	256	47
NM_000372	TYR	11;88910843-88911267	15	425	48
NM_000372	TYR	11;88916033-88916262	5108	230	18

La identificación de sitios de unión de MITF en el locus de *SERPINF1* junto con el resultado obtenido por el análisis de la expresión del hnRNA de *PEDF* y *MITF* en diferentes líneas de melanoma sugiere una posible regulación transcripcional directa de *PEDF* por MITF. Serían necesarios abordajes experimentales directos, como un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina para la Polimerasa II (ChIP) en células control e interferidas para MITF así como ensayos reporteros donde se haya clonado el primer intrón de *SERPINF1*, para demostrar que MITF es un regulador transcripcional directo de *PEDF*.

En resumen, en el modelo del *phenotype switching* MITF es considerado como uno de los genes clave para la clasificación de las líneas de melanoma en cohortes proliferativo (alto MITF) e invasivo (bajo MITF) según su perfil de expresión génica (Hoek *et al.*, 2008). Nuestro grupo ha demostrado que niveles altos de *PEDF* están asociados al cohorte de líneas de melanoma de perfil proliferativo (Orgaz *et al.*, 2009). Esta correlación directa entre *MITF* y *PEDF* se observa en biopsias de melanoma de diverso grado de malignidad. Adicionalmente, la interferencia de MITF conlleva una pérdida de la expresión de *PEDF*. Por último, el análisis de las regiones reguladoras de *SERPINF1* junto con los resultados de ChIP-seq para MITF en melanoma nos ha permitido identificar sitios putativos de regulación para MITF. En conjunto estos datos demuestran el papel de MITF como uno de los reguladores clave de *PEDF* en la progresión maligna del melanoma.

### 2.3. Hipoxia

Como hemos visto, la adquisición de un fenotipo senescente por parte del melanocito está implicado en la regulación de PEDF y podría explicar la baja expresión de este factor en lesiones senescentes como el *naevus*. Sin embargo, la alta expresión de PEDF en melanomas primarios y su descenso en lesiones más invasivas (melanomas de crecimiento vertical y metástasis) debe estar mediado por otros mecanismos, entre los que se podría encontrar la regulación transcripcional por MITF.

Datos previos describen que ciertos tejidos en condiciones fisiológicas presentan niveles de oxígeno inferiores al 21% atmosférico. Se observan porcentajes de oxígeno en torno al 2-3% en cerebro, hígado y miocardio, así como un 9-10% en bazo (Vaupel *et al.*, 1989). Por su parte, la piel constituye también un tejido de bajo nivel de oxígeno, donde los porcentajes de O<sub>2</sub> varían desde un 10% en dermis hasta un 0,5% en las últimas capas de la epidermis (estrato córneo) (Evans *et al.*, 2006). Por tanto, los melanocitos localizados entre la dermis y la epidermis (estrato basal), se encuentran en un ambiente hipóxico que favorece la transformación oncogénica de las células promoviendo la proliferación y supervivencia, evitando a su vez la entrada en senescencia (Bedogni *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha descrito a la hipoxia como un factor clave en el inicio de la formación de melanomas, que junto con la adquisición de otras modificaciones oncogénicas (mutaciones en *BRAF* y *AKT*), induce alteraciones en la homeostasis del melanocito (Bedogni *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado su implicación en procesos de transición epitelio-mesénquima, aumento de invasión, aumento de la expresión de factores pro-angiogénicos y resistencia a *anoikis* (Bedogni and Powell, 2009).

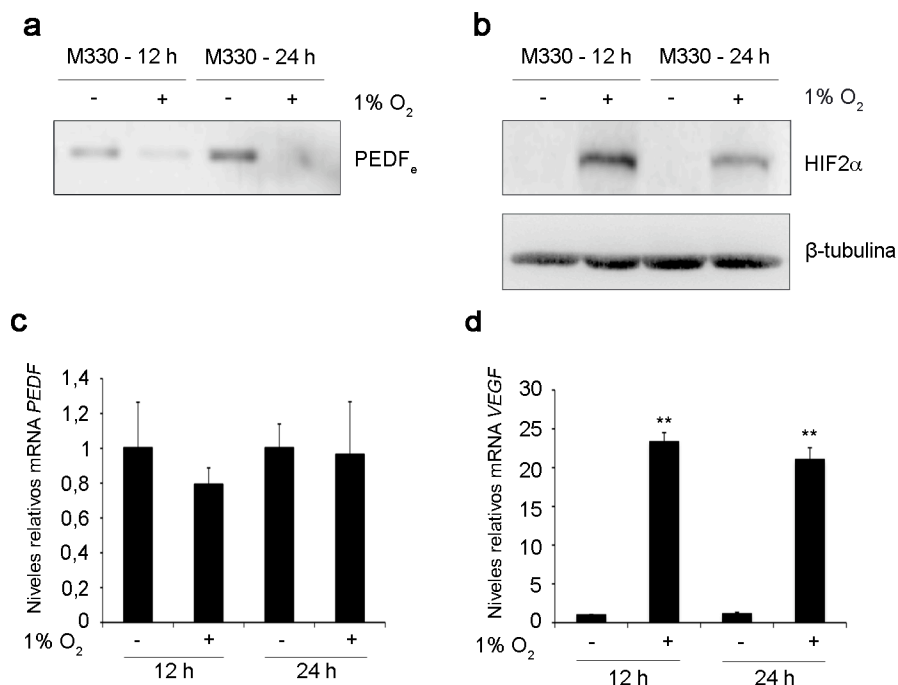
Estos antecedentes junto con los estudios previos en los que se describe que bajas concentraciones de oxígeno regulan negativamente los niveles de proteína de PEDF en otros tipos celulares (Dawson *et al.*, 1999; Notari *et al.*, 2005), nos llevaron a pensar que la hipoxia podría ser un regulador negativo de la expresión de PEDF en el melanoma y su progresión.

#### 2.3.1. La hipoxia reduce la expresión de PEDF a nivel de proteína en cultivos primarios de melanocitos y en líneas de melanoma

Para determinar si la hipoxia podía ser un regulador de PEDF, incubamos cultivos primarios de melanocitos en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) a diferentes tiempos. El análisis por *Western blot* del medio condicionado (MC) mostró una bajada de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) a 12 h y 24 h (Figura 26a). Sin embargo al analizar los niveles de mRNA de *PEDF* mediante RT-PCR cuantitativa no observamos ningún descenso en hipoxia, permaneciendo los valores constantes en todas las condiciones (Figura 26c). Se chequeó por *Western blot* la estabilización del

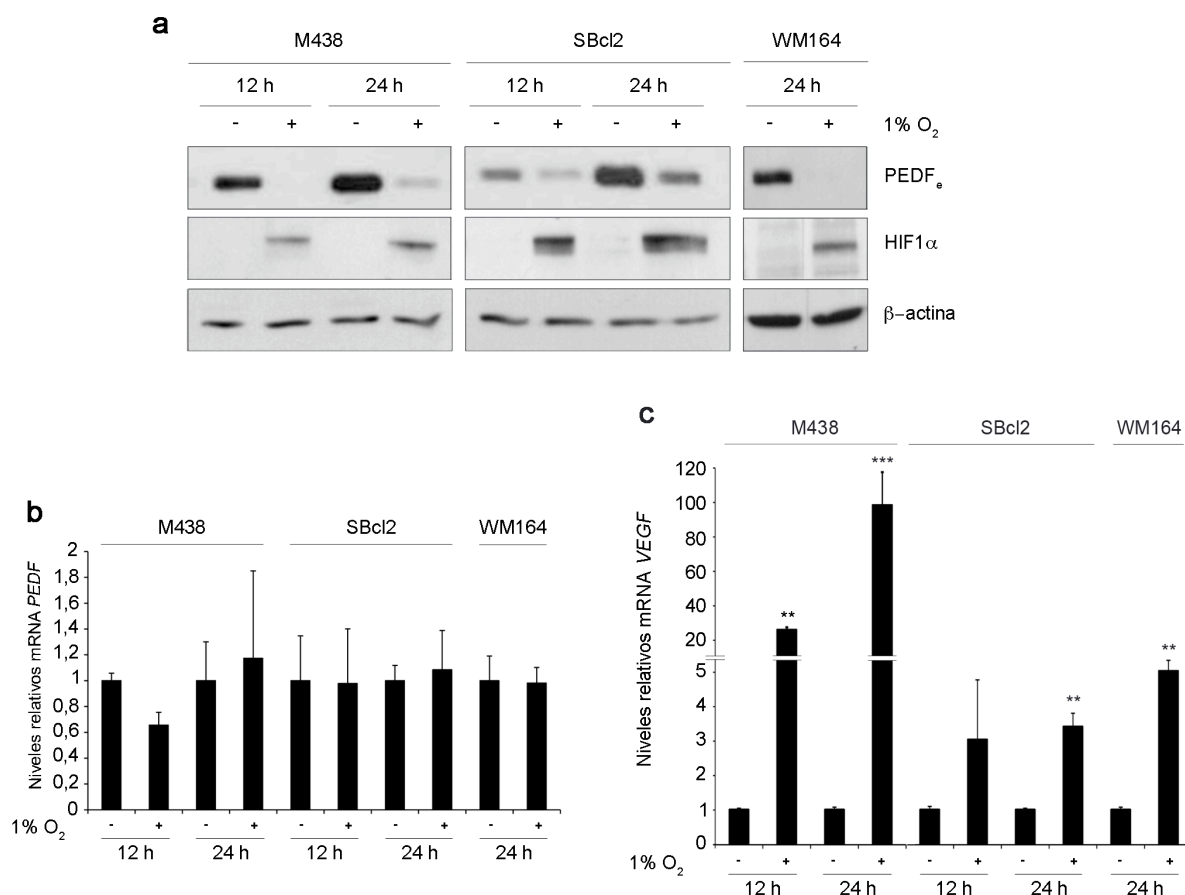
## Resultados

factor de transcripción inducible por hipoxia 2 $\alpha$  (HIF2 $\alpha$ ) (Figura 26b) y como control de su actividad se analizó el mRNA de *VEGF*, diana transcripcional directa de HIF (Figura 26d).



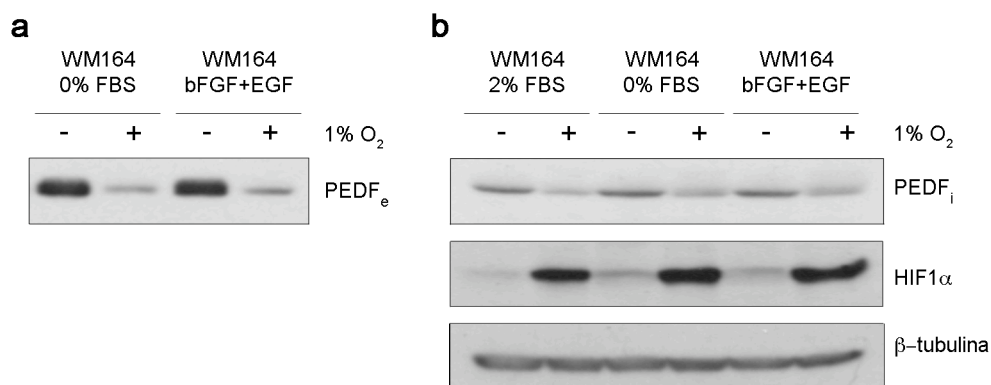
**Figura 26. Disminución de los niveles de proteína de PEDF por hipoxia en melanocitos.** Análisis por *Western blot* de los niveles de (a) PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y (b) HIF2 $\alpha$  en extractos totales de proteína del cultivo primario de melanocitos M330 incubado en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 12 h y 24 h. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga. (c-d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de (c) mRNA de *PEDF* y (d) *VEGF* en el cultivo primario de melanocitos M330 incubado en normoxia e hipoxia durante 12 h y 24 h. Los niveles de mRNA de *PEDF* y *VEGF* se muestran relativizados a las células en normoxia después de una normalización con  $\beta$ -actina. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*, *P*<0,01).

De la misma forma, también quisimos comprobar la regulación de PEDF por hipoxia en líneas de melanoma poco agresivas en las que ya se había chequeado la expresión de este factor (Orgaz *et al.*, 2009). El análisis por *Western blot* de MC de las líneas de melanoma SBcl2 (fase de crecimiento radial) y WM164 (metástasis poco agresiva) reveló una bajada de los niveles extracelulares de proteína PEDF en hipoxia (Figura 27a) similar a la que observamos en el cultivo primario de melanocitos M438 que se utilizó de control. De acuerdo con el resultado en melanocitos, el mRNA de *PEDF* no mostró ningún cambio en hipoxia en comparación con normoxia en las líneas analizadas (Figura 27b). Como control positivo de la activación de HIF se analizó el mRNA de *VEGF* (Figura 27c).



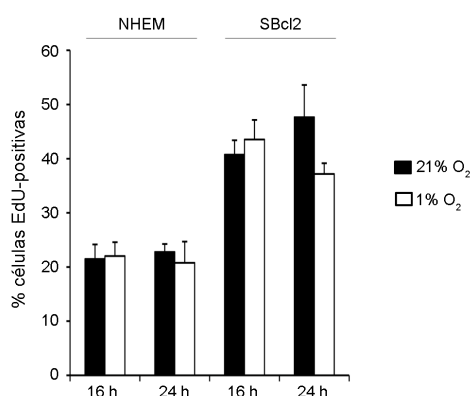
**Figura 27. Disminución de los niveles de proteína de PEDF por hipoxia en líneas de melanoma poco agresivas.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y de HIF1α en extractos totales del cultivo primario de melanocitos (M438) y las líneas de melanoma SBcl2 y WM164 incubadas 12 h y 24 h en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>). Se usó β-actina como control de carga. (b, c) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de (b) mRNA de *PEDF* y (c) *VEGF* en condiciones de normoxia e hipoxia durante 12 h y 24 h. Los niveles de mRNA de *PEDF* y *VEGF* se muestran relativizados a las células en normoxia después de una normalización con β-actina. Las barras representan media ± DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (P) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ).

Para poder detectar PEDF en el medio condicionado necesitamos mantener las células en ausencia de suero durante los tratamientos debido a que la albúmina interfiere en la detección de PEDF por *Western blot* al tener ambas proteínas un peso molecular muy similar. Para asegurarnos de que la bajada de PEDF en hipoxia era únicamente debida a los bajos niveles de oxígeno y no a la ausencia de suero, incubamos la línea de melanoma WM164 en normoxia e hipoxia en las siguientes condiciones: (i) ausencia de suero, (ii) ausencia de suero pero en presencia de factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos tipo beta (bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF)) y (iii) en medio completo con suero. El resultado que observamos fue el descenso de los niveles de proteína de PEDF en hipoxia en todas las condiciones mencionadas (Figura 28a-b) indicando que la regulación de este factor por hipoxia es independiente de la presencia o no de factores de crecimiento.



**Figura 28. La hipoxia reduce los niveles de PEDF en la línea de melanoma WM164 tanto en presencia como en ausencia de factores de crecimiento.** (a, b) Análisis por *Western blot* de los niveles de (a) PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y (b) PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) y HIF1 $\alpha$  en extractos totales de la línea de melanoma WM164. Las células se crecieron en medio basal con o sin suero fetal bovino (2% FBS ó 0% FBS respectivamente), ó sin FBS en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos tipo beta (bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (bFGF+EGF) en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24h. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga.

Adicionalmente, también comprobamos que la hipoxia no estaba comprometiendo el estado proliferativo de las células analizando la síntesis de DNA de cultivos primarios de melanocitos y de la línea de melanoma SBcl2 en presencia prolongada de bajos niveles de oxígeno (Figura 29).



**Figura 29. La hipoxia no varía la velocidad de síntesis de DNA en cultivos primarios de melanocitos y la línea de melanoma SBcl2.** Incorporación de 5-etinil-2-deoxiuridina (EdU) en melanocitos primarios (NHEM) y en la línea de melanoma SBcl2. Las células crecieron en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 16 h y 24 h, y las últimas 4 h en presencia de 20  $\mu$ M EdU. Las barras representan media  $\pm$  DE.

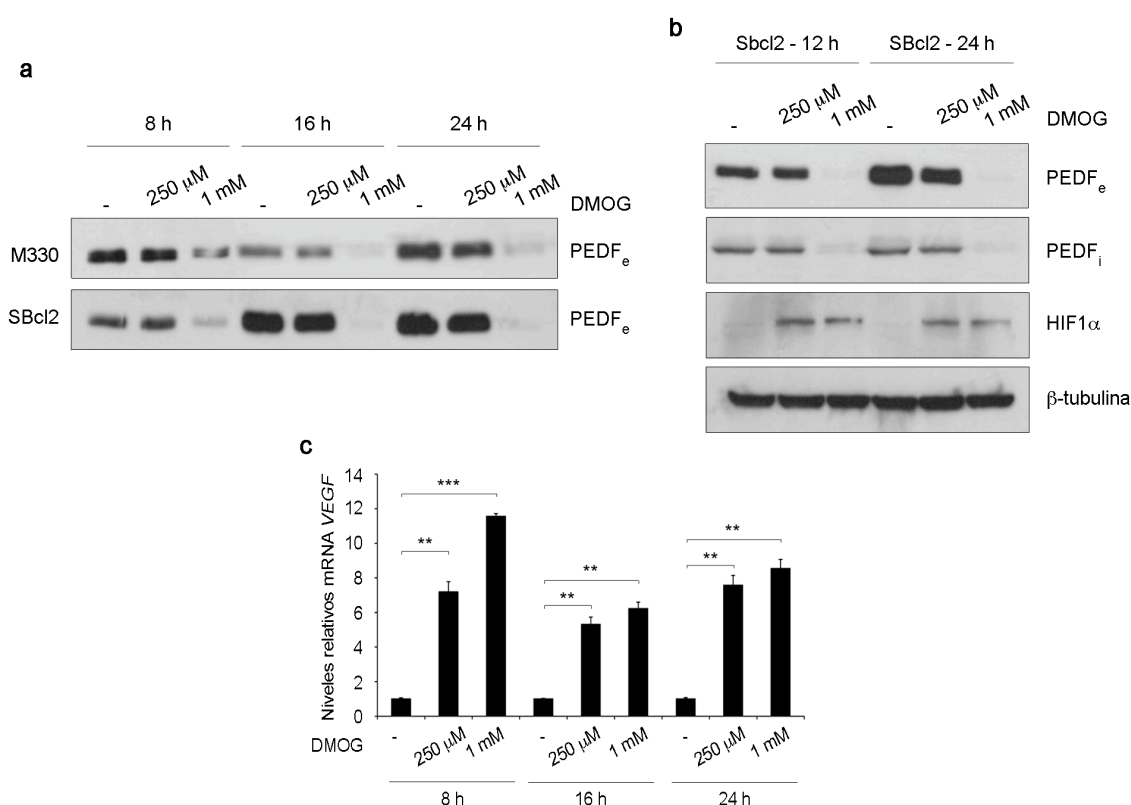
### 2.3.2. La bajada de expresión de PEDF en hipoxia es un proceso dependiente de las PHDs e independiente de HIF1 $\alpha$

La estabilización y actividad de la proteína de HIF es un proceso regulado en su inicio por las prolinhidroxilasas (PHDs), que en presencia de oxígeno hidroxilan dos residuos prolina, marcándola para su posterior degradación en el proteasoma. Este paso es un punto crítico en la respuesta celular a la hipoxia, por lo que quisimos comprobar el efecto de la inhibición de las PHDs en la regulación de PEDF.

Además de oxígeno, las PHDs requieren ascorbato y 2-oxoglutarato como co-substratos, por lo que usamos como inhibidor un antagonista sintético del 2-oxoglutarato, DMOG (N-



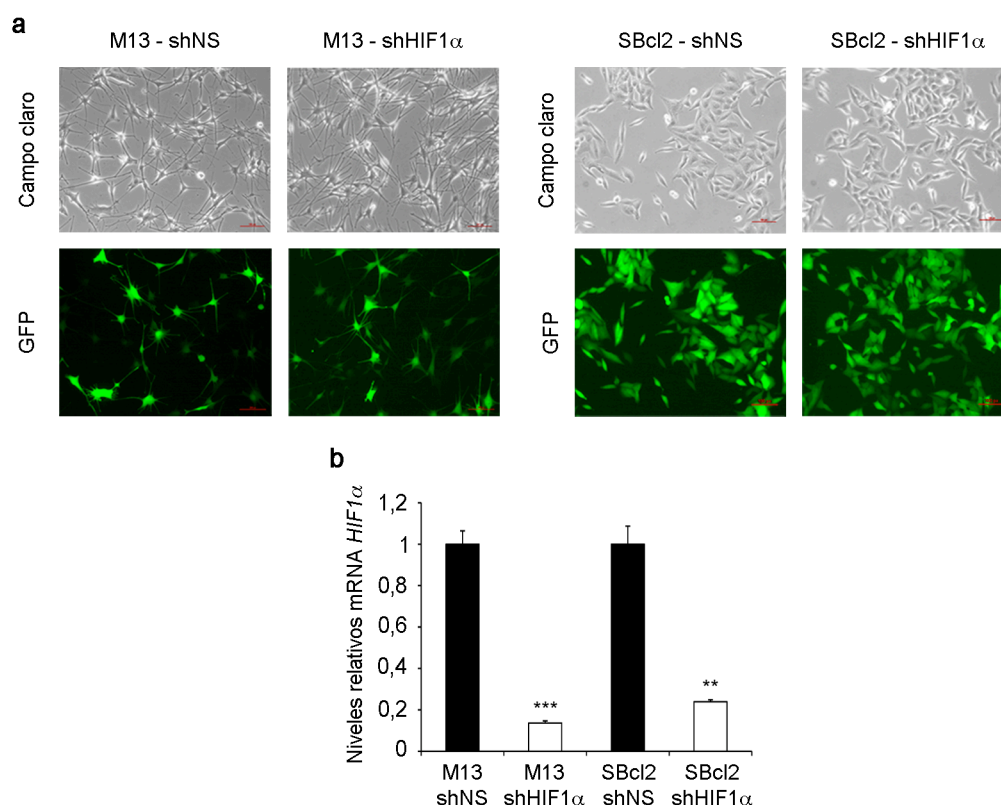
(methoxyoxoacetyl)-glycine methyl ester). El tratamiento con 1 mM DMOG en un cultivo primario de melanocitos (M330) y en la línea de melanoma SBcl2 produjo una bajada de PEDF<sub>e</sub> en el MC dependiente del tiempo (Figura 30a). Cuando analizamos el efecto del DMOG en el PEDF<sub>i</sub> por *Western blot* observamos el mismo patrón de regulación que en el PEDF secretado (Figura 30b). Como esperábamos, detectamos la estabilización de HIF1 $\alpha$  en presencia de DMOG (Figura 30b). Como control positivo de la actividad del DMOG se analizó la respuesta del mRNA de *VEGF* ante las diferentes dosis utilizadas (Figura 30c). Lo que observamos es que la bajada de expresión de PEDF requiere una concentración de DMOG significativamente más elevada que la necesaria para la estabilización de HIF1 $\alpha$ . Estos resultados sugieren que existe una diferencia entre la dosis requeridas para la estabilización de HIF1 $\alpha$  y la reducción total de PEDF a nivel de proteína, de lo que entendemos que la regulación de PEDF en hipoxia es un proceso dependiente de las PHDs pero independiente de HIF1 $\alpha$ .



**Figura 30. La inhibición de las PHDs provoca un descenso en los niveles de proteína de PEDF en presencia de oxígeno.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) del cultivo primario de melanocitos (M330) (panel superior) y la línea de melanoma SBcl2 (panel inferior) tratadas con diferentes dosis de DMOG a 8 h, 16 h y 24 h. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF<sub>e</sub> en MC y de PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) y HIF1 $\alpha$  en extractos totales de la línea de melanoma SBcl2 tras 12 h y 24 h de tratamiento con diferentes dosis de DMOG. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga. (c) RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *VEGF* en la línea de melanoma SBcl2 en respuesta a diferentes dosis de DMOG a 8 h, 16 h y 24 h. Los niveles de mRNA de *VEGF* se muestran relativizados a los controles sin DMOG en cada tiempo después de normalizarse con los niveles de *18s rRNA*. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*, *P*<0,01; \*\*\*, *P*<0,001).

## Resultados

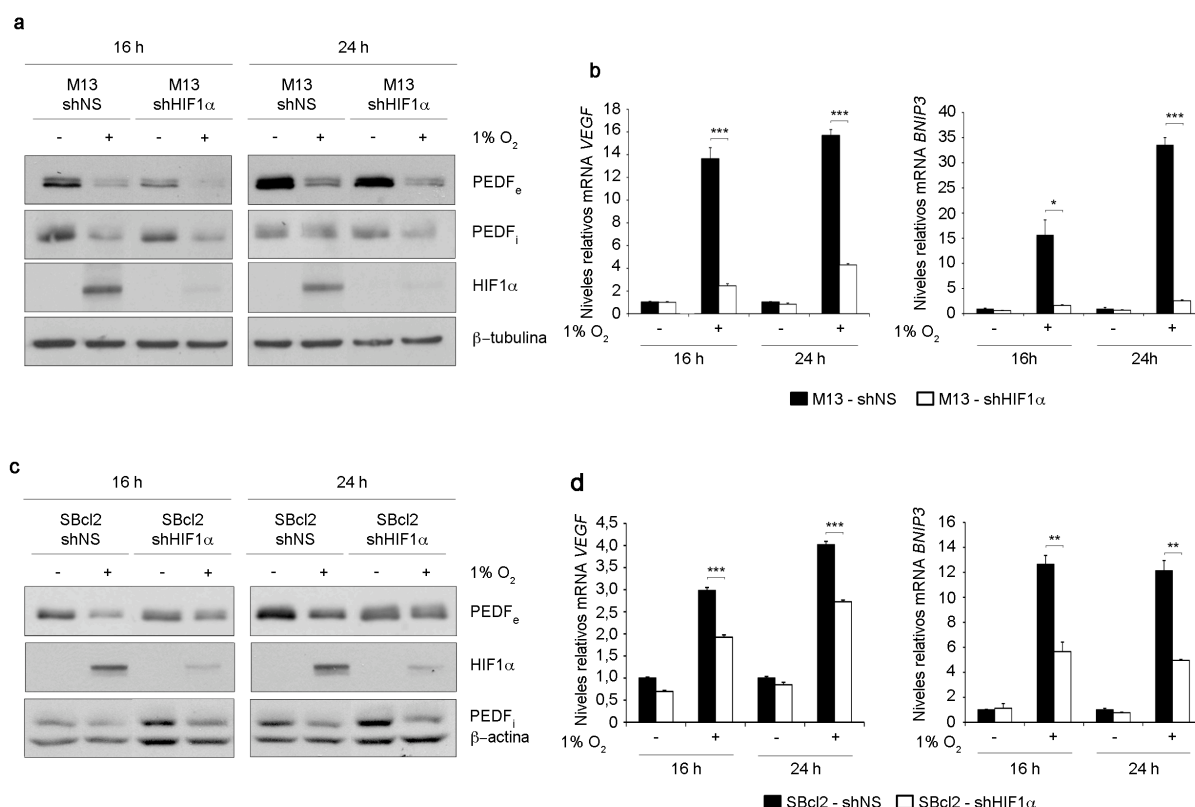
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al tratar las células con inhibidor de las PHDs, quisimos comprobar de forma directa si la regulación de PEDF en hipoxia era un proceso independiente de HIF. Para ello, utilizamos un cultivo primario de melanocitos (M13) y la línea de melanoma SBcl2 donde interferimos la expresión de HIF1 $\alpha$  introduciendo un shRNA<sup>mir</sup> específico de HIF1 $\alpha$  (shHIF1 $\alpha$ ) mediante transducción lentiviral; asimismo utilizamos como control un shRNA<sup>mir</sup> sin homología con ningún gen conocido (shNS) (Figura 31a). Se cuantificó el silenciamiento de la expresión de HIF1 $\alpha$  mediante RT-PCR cuantitativa, siendo el porcentaje de interferencia del 87% en melanocitos M13-shHIF1 $\alpha$  y del 76% en SBcl2-shHIF1 $\alpha$  con respecto a sus controles shNS (Figura 31b).



**Figura 31. Silenciamiento de HIF1 $\alpha$  en melanocitos humanos y en la línea de melanoma SBcl2.** (a) Eficiencia de transducción del cultivo primario de melanocitos (M13) (izquierda) y de la línea de melanoma SBcl2 (derecha) tras la infección con lentivirus control no interferente (shNS) o interferente para HIF1 $\alpha$  (shHIF1 $\alpha$ ) a una multiplicidad de infección (MOI) de 40 (M13) ó 60 (SBcl2). Las imágenes de fluorescencia muestran un porcentaje de células GFP positivas superior al 95% (20x aumentos). (b) RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de HIF1 $\alpha$  en las líneas de melanocitos M13-shNS, M13-shHIF1 $\alpha$  y en las líneas de melanoma SBcl2-shNS, SBcl2-shHIF1 $\alpha$ . Se muestran los niveles de mRNA de HIF1 $\alpha$  relativos a las líneas celulares shNS tras la normalización con los niveles de 28s rRNA. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (P) del test de Student (\*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ).

A pesar de que obtuvimos una eficiencia próxima al 80% al interferir HIF1 $\alpha$  en melanocitos humanos, se continuó observando una bajada de PEDF extracelular e intracelular en condiciones de hipoxia en las células en las que se había silenciado HIF1 $\alpha$  (Figura 32a). Para confirmar el grado de interferencia de la actividad de HIF1 $\alpha$  se determinaron los niveles de mRNA de VEGF y BNIP3, que

son dos dianas transcripcionales directas de HIF1 $\alpha$ ; y en ambos casos, la inducción de sus mRNA en hipoxia se vio reducida en las líneas shHIF1 $\alpha$  (Figura 32b). Los resultados obtenidos en melanocitos fueron corroborados en la línea de melanoma SBcl2 donde la interferencia de HIF1 $\alpha$  no impidió la bajada de PEDF extracelular e intracelular por hipoxia (Figura 32c). Sin embargo, si encontramos diferencias al analizar el mRNA de *VEGF* y *BNIP3*, donde la interferencia de HIF1 $\alpha$  redujo su activación en hipoxia en menor extensión que en los melanocitos primarios (Figura 32d). Este resultado podría ser debido a las diferencias existentes en la regulación de las dianas HIF1 $\alpha$  en melanocitos humanos en comparación con las líneas de melanoma como consecuencia de las alteraciones genéticas y la alteración de rutas de señalización en el melanoma.



**Figura 32: El silenciamiento de HIF1 $\alpha$  no bloquea la bajada en proteína de PEDF en hipoxia.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y de PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) y HIF1 $\alpha$  en extractos totales de las líneas M13-shNS y M13-shHIF1 $\alpha$  incubadas en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 16 h y 24 h. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga. (b) RT-PCR de los niveles de mRNA de *VEGF* (izquierda) y *BNIP3* (derecha) de las líneas M13-shNS y M13-shHIF1 $\alpha$  en normoxia e hipoxia durante 16 h y 24 h. Los niveles de mRNA de *VEGF* y *BNIP3* se relativizaron con respecto a la línea M13-shNS en normoxia en cada tiempo tras la normalización por *18s rRNA* (para mRNA de *VEGF*) y *28s rRNA* (para mRNA de *BNIP3*). Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*, *P*<0,05; \*\*\*, *P*<0,001). (c) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF<sub>e</sub> en MC y PEDF<sub>i</sub> y HIF1 $\alpha$  en extractos totales de las líneas de melanoma SBcl2-shNS y SBcl2-shHIF1 $\alpha$  incubadas en normoxia e hipoxia durante 16 h y 24 h. Se usó  $\beta$ -actina como control de carga. (d) RT-PCR de los niveles de mRNA de *VEGF* (izquierda) y *BNIP3* (derecha) de las líneas SBcl2-shNS y SBcl2-shHIF1 $\alpha$  en normoxia e hipoxia durante 16 h y 24 h. Los niveles de mRNA de *VEGF* y *BNIP3* se relativizaron con respecto a la línea SBcl2-shNS en normoxia en cada tiempo tras la normalización por *18s rRNA* (para mRNA de *VEGF*) y *28s rRNA* (para mRNA de *BNIP3*). Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*, *P*<0,01; \*\*\*, *P*<0,001).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el metanálisis de 16 experimentos independientes de ChIP para HIF1 $\alpha$  realizado por L. del Peso y colaboradores demostró que no existía ninguna variación en los niveles de mRNA de *PEDF* en condiciones de normoxia *versus* hipoxia (Ortiz-Barahona *et al.*, 2010). Adicionalmente se realizó una búsqueda mediante herramientas bioinformáticas de sitios conservados de unión HRE (*hypoxia response elements*) necesarios para la función transcripcional de HIF1 $\alpha$  en el locus *SERPINF1*. Aunque se rastreó todo el gen de *SERPINF1* así como 5 kb por delante de la región promotora, no se halló ninguna secuencia HRE con un *score* significativo y altamente conservada entre especies que pudiera ser considerada como un sitio putativo de unión para HIF1 $\alpha$ .

Estos resultados demuestran no sólo la ausencia de regiones de unión de HIF1 $\alpha$  a PEDF, sino también la falta de inducción del mRNA de *PEDF* por HIF1 $\alpha$  en hipoxia, descartando así una posible regulación transcripcional directa de PEDF por HIF1 $\alpha$ .

### 2.3.3. La disminución de los niveles de expresión de PEDF en hipoxia no es un proceso mediado por las UTRs

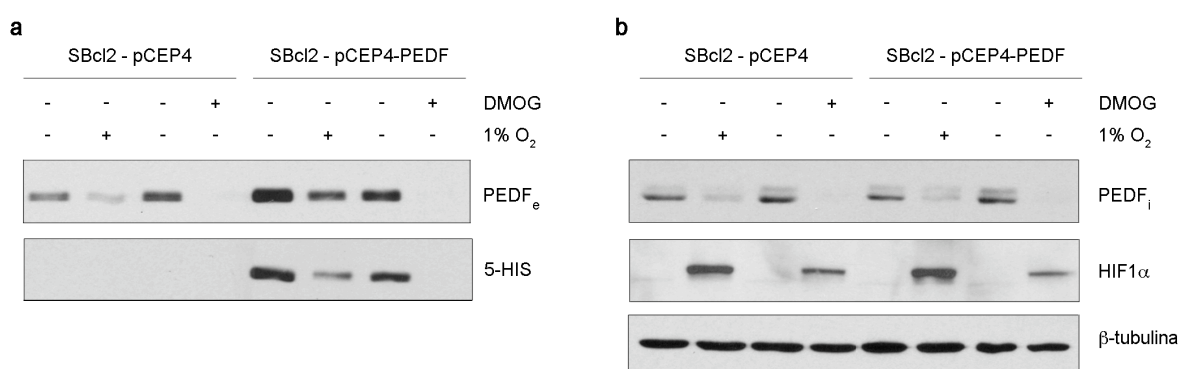
La ausencia de variación en los niveles de mRNA de *PEDF* en cultivos primarios de melanocitos y en varias líneas de melanoma sugieren que la bajada en proteína de PEDF en hipoxia no es debida a un mecanismo de regulación transcripcional, sino post-transcripcional. Estos resultados son coincidentes con estudios previos que describen la regulación de PEDF por hipoxia en células RPE y células de retinoblastoma (Dawson *et al.*, 1999; Notari *et al.*, 2005).

Para determinar si PEDF pudiera estar sufriendo una regulación a nivel de la traducción, lo que hicimos fue analizar los niveles de mRNA de *PEDF* unido a polisomas (mRNAs en proceso de traducción) y ribosomas libres (mRNAs que no se están traduciendo). Para ello, crecimos las líneas de melanoma en condiciones de normoxia e hipoxia a diferentes tiempos y analizamos los niveles de mRNA de *PEDF* en las diferentes fracciones obtenidas tras la separación de los extractos celulares mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. Como controles de regulación de la traducción por hipoxia analizamos los niveles de mRNA de *HIF1 $\alpha$*  y *GAPDH* unidos a polisomas en células Hela, donde M. Gorospe y colaboradores habían descrito un incremento de la tasa de traducción de *HIF1 $\alpha$*  en hipoxia sin variación de la traducción de *GAPDH* (Galban *et al.*, 2008). Aunque reproducimos en células Hela los datos obtenidos por M. Gorospe, no pudimos llegar a ninguna conclusión en las líneas de melanoma debido a que presentan una tasa proliferativa tan baja que en condiciones de normoxia no observábamos el pico de mRNA unido a polisomas, tanto para *GAPDH* como para *PEDF*.

A continuación, analizamos si la regulación de PEDF podría ser un proceso mediado por regiones controladoras ubicadas en las UTRs. Para ello determinamos el efecto que tenía la hipoxia sobre un PEDF exógeno carente de las regiones 5' y 3' UTR (pCEP4-PEDF) expresado constitutivamente a partir del promotor CMV. Para ayudar a su identificación, este PEDF exógeno presentaba en 3' una

cola de histidinas que puede ser reconocida por un anticuerpo específico (5-HIS). Transfectamos establemente la línea de melanoma SBcl2 con el vector pCEP4-PEDF (SBcl2-pCEP4-PEDF) o con su vector control (SBcl2-pCEP4) y chequeamos la expresión tanto del PEDF endógeno como del exógeno en condiciones de hipoxia y en presencia del inhibidor de PHDs DMOG.

Como esperábamos, el análisis por *Western blot* de la línea control SBcl2-pCEP4 reveló una bajada en el PEDF endógeno, tanto secretado como intracelular, en hipoxia y al tratar con DMOG (Figura 33a-b). En el caso de la línea SBcl2-pCEP4-PEDF observamos que la hipoxia y el tratamiento con DMOG produjeron una reducción en los niveles de proteína del PEDF, tanto endógeno como exógeno, similar al observado en las células control (Figura 33a-b).



**Figura 33. Detección del PEDF endógeno y exógeno en las líneas de melanoma SBcl2-pCEP4 y SBcl2-pCEP4-PEDF.** (a-b) Análisis por *Western blot* de los niveles de (a) PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) total y exógeno (5-HIS) en el medio condicionado (MC) y de (b) PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) total y HIF1α en extractos totales de las líneas SBcl2-pCEP4 y SBcl2-pCEP4-PEDF incubadas en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) y en presencia de DMOG (1 mM) durante 24 h. Se utilizó β-tubulina como control de carga.

Dado que el PEDF exógeno transfectado en la línea SBcl2 carece de las regiones UTR, estos resultados indican que la regulación de PEDF en hipoxia no es debida a una inhibición de la traducción a través de las UTRs. Para demostrar esta hipótesis de una forma directa, clonamos la región 3' UTR de PEDF en el extremo 3' del gen de Renilla del vector reportero psiCHECK-2 y analizamos su actividad en condiciones de normoxia e hipoxia. Del mismo modo, también clonamos la región 3' UTR de GAPDH como control, ya que está descrito que la hipoxia no modifica la traducción de su mRNA (Galban *et al.*, 2008).

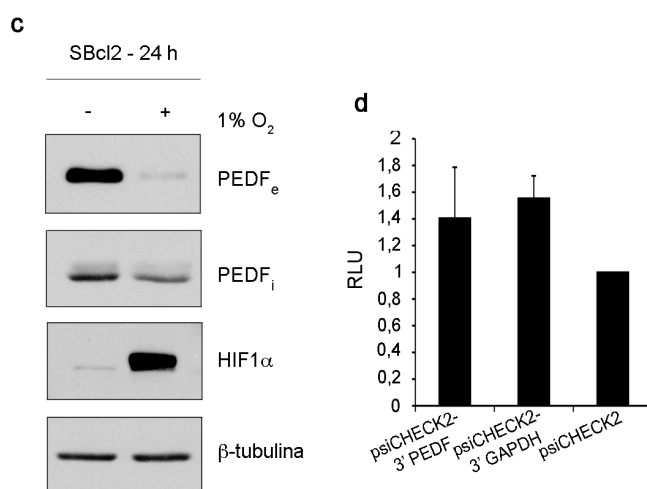
En primer lugar confirmamos la bajada de PEDF en hipoxia a nivel de proteína en la línea de melanoma SBcl2, analizando también la expresión de HIF1α como control de la activación de la respuesta celular a la hipoxia (Figura 34a). A continuación, en experimentos de transfección transitoria, no detectamos ninguna variación significativa en los niveles relativos de Renilla cuando comparábamos el vector psiCHECK2-3'PEDF con el vector vacío ó con psiCHECK2-3'GAPDH

## Resultados

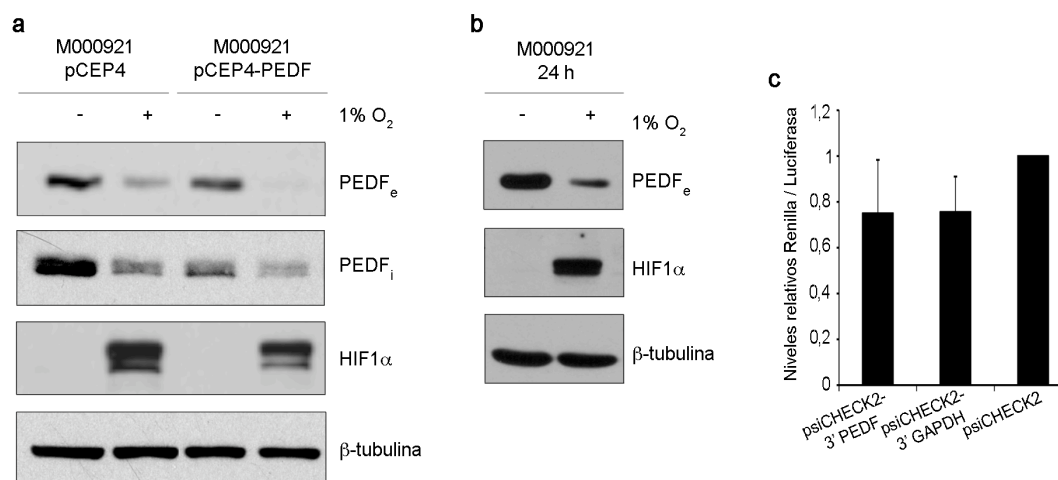
(Figura 34b). Estos resultados también fueron confirmados en la línea de melanoma de perfil proliferativo M000921 que presenta una alta eficiencia de transfección, donde los niveles de PEDF, tanto extracelular como intracelular, son eficientemente regulados por hipoxia (Figura 35a-c).

Además del resultado obtenido a partir del PEDF exógeno carente de las regiones 5' y 3' UTR, hicimos uso de herramientas bioinformáticas para predecir secuencias de unión para las *RNA Binding Proteins* (RBP) HuR y TIA-1 (Lopez de Silanes *et al.*, 2004, 2005). Las RBP son proteínas que se encargan de coordinar todo el proceso de regulación del mRNA, desde la transcripción hasta finalmente su traducción (Keene, 2007). Para ello, las RBP necesitan unirse a secuencias *ARE*, basadas en la repetición de residuos adenina y uracilo presentes en las UTRs del mRNA diana (Brennan and Steitz, 2001). Aunque encontramos una pequeña región rica en adeninas y uracilos en la 3' UTR de *PEDF* (Tabla 11, secuencia remarcada en negrita), fue descartada como un posible sitio de unión a HuR y TIA-1 debido a que carecía de conservación entre especies y la estructura secundaria necesaria para su unión con RBP.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos concluir que la bajada de PEDF que observamos a nivel de proteína en hipoxia no es debida a una inhibición de la traducción por las regiones UTR de PEDF.



**Figura 34. La regulación de PEDF por hipoxia en la línea de melanoma SBcl2 no es debido a una inhibición de la traducción mediada por la 3' UTR.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) y HIF1α en extractos totales de la línea de melanoma SBcl2 en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 h. Se usó β-tubulina como control de carga. (b) Ensayo reportero en la línea de melanoma SBcl2 transfectada con un vector que contiene las regiones 3' UTR de PEDF (psiCHECK2-3'PEDF), 3' UTR de GAPDH (psiCHECK2-3'GAPDH) ó vector vacío (psiCHECK2) en la región 3' del gen de Renilla. Las células se incubaron en normoxia e hipoxia durante 24 h. Se muestra la inducción de los niveles relativos de Renilla de cada vector en hipoxia con respecto a la normoxia tras corregir por los niveles de Luciferasa. Las barras representan media ± DE.



**Figura 35. La regulación de PEDF por hipoxia en la línea de melanoma M000921 no es debido a una inhibición de la traducción mediada por la 3' UTR.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) y HIF1α en extractos totales de las líneas M000921-pCEP4 y M000921-pCEP4-PEDF incubadas en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 h. Se usó β-tubulina como control de carga. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF<sub>e</sub> en MC y HIF1α en extractos totales de la línea de melanoma M000921 incubada en normoxia e hipoxia durante 24 h. Se usó β-tubulina como control de carga. (c) Ensayo reportero en la línea de melanoma M000921 transfectada con un vector que contiene las regiones 3' UTR de PEDF (psiCHECK2-3'PEDF), 3' UTR de GAPDH (psiCHECK2-3'GAPDH) ó vector vacío (psiCHECK2) en la región 3' del gen de Renilla. Las células se incubaron en normoxia e hipoxia durante 24 h. Se muestra la inducción de los niveles relativos de Renilla de cada vector en hipoxia con respecto a la normoxia tras corregir por los niveles de Luciferasa. Las barras representan media ± DE.

**Tabla 11. Secuencias UTR de PEDF**

	Tamaño	Secuencia
5' UTR	157 pb	ggucgcuuaagaaaggaguagcuguaaucugaagccugcuggacgcuggauuagaaggcagcaaaaaa gcucugugcuggcuggagccccucagugcaggcuuagagggacuaggcuggguguggagcugcagc guauccacaggccccagg
3'UTR	128 pb	uaucacaguuuauuuccaauacccuagaagaaaacccgaggagcagcagauuccacaggacacgaaggcu gccccguuagguuucuuagcauacaauaaaagagcuuuauuccuuaacuucuguua



#### 2.3.4. La regulación de PEDF en hipoxia no es debida a un proceso de degradación vía proteasoma o metaloproteinasas

Hasta el momento hemos demostrado que la regulación de PEDF en hipoxia en melanocitos y células de melanoma ocurre mediante un mecanismo post-transcripcional independiente de HIF1 $\alpha$ . Por otro lado, el análisis funcional de las UTRs de PEDF nos indicó que estas regiones no están implicadas en la regulación de los niveles de PEDF por hipoxia en células de melanoma. Teniendo en cuenta estos resultados, el siguiente mecanismo que decidimos explorar fue la posible degradación de la proteína de PEDF en condiciones de hipoxia.

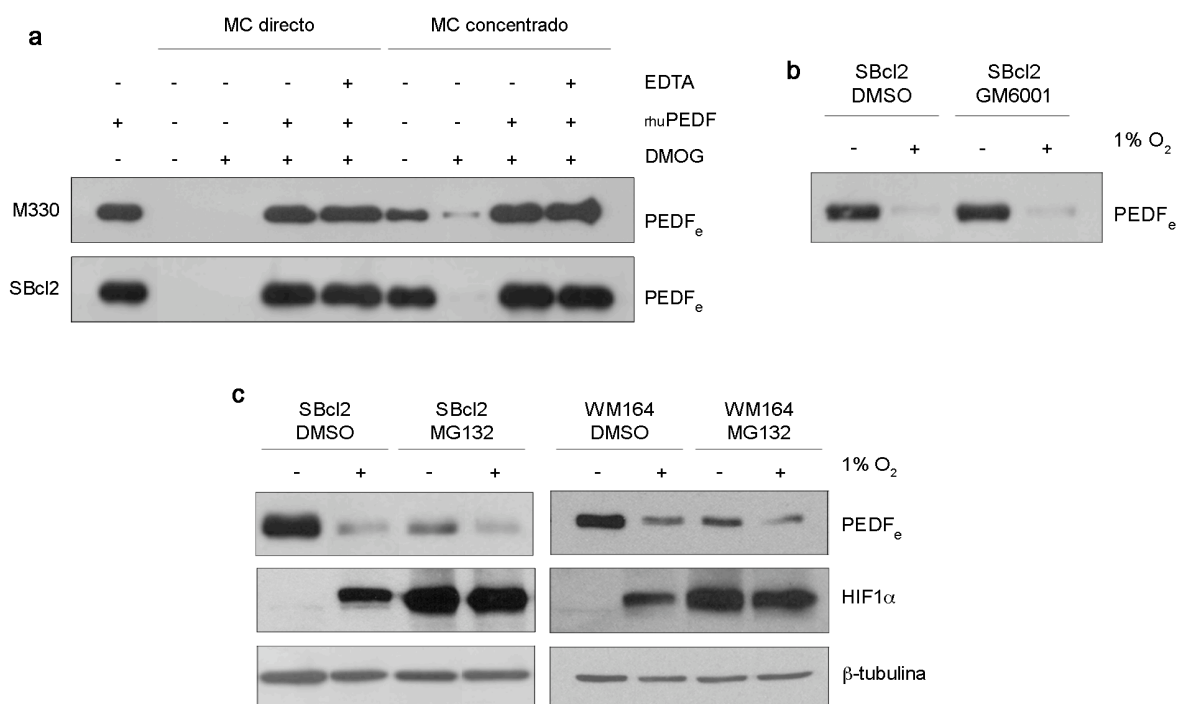
SP. Becerra y colaboradores describieron en un trabajo previo que el PEDF secretado por las células RPE es degradado extracelularmente por la activación de metaloproteinasas de la matriz tipo 2 (MMP-2) y tipo 9 (MMP-9) en condiciones de hipoxia (Notari *et al.*, 2005). Las MMP-2 y MMP-9 pertenecen a una gran familia de proteinasas extracelulares dependientes de Zn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> que participan de forma activa en la regulación de la migración, invasión y angiogénesis (Chang and Werb, 2001; Kessenbrock *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos comprobar si este mecanismo post-traducciona l pudiera ser el responsable del descenso de los niveles de proteína de PEDF en melanocitos y células de melanoma.

Para ello, partimos de medio condicionado de melanocitos y células SBcl2 control y tratadas con DMOG para determinar si las metaloproteinasas (MMPs) liberadas al medio en condiciones de hipoxia podrían degradar un PEDF humano recombinante purificado (rhuPEDF) añadido exógenamente. Aunque se confirmó la disminución de PEDF endógeno al comparar el medio condicionado concentrado de melanocitos ó células SBcl2 control *vs* tratadas con DMOG, la incubación *in vitro* del medio condicionado, tanto directo como concentrado, con el rhuPEDF no produjo ninguna disminución del PEDF exógeno (Figura 36a). Se utilizó EDTA como inhibidor de la actividad proteasa en hipoxia. Adicionalmente, se trataron las células SBcl2 con el inhibidor de metaloproteinasas GM6001, y de acuerdo con los resultados previos, no se observó una recuperación de los niveles de proteína de PEDF extracelular en hipoxia (Figura 36b).

Otro de los mecanismos post-traduccionales que podrían estar regulando a PEDF en hipoxia es su degradación vía proteasoma. Para explorar esta vía, tratamos las líneas de melanoma Sbcl2 y WM164 con el inhibidor del proteasoma MG132 y las incubamos en normoxia e hipoxia para detectar qué ocurría con los niveles de PEDF. Lo que observamos es que el tratamiento con MG132 no contribuyó a la recuperación de los niveles de PEDF detectados en normoxia (Figura 36c).

De esta manera descartamos que en melanocitos y líneas de melanoma, la disminución de PEDF en hipoxia fuera consecuencia de un proceso de degradación mediado por metaloproteinasas o por el proteasoma.





**Figura 36. La regulación de PEDF en hipoxia no es un proceso de degradación mediado por metaloproteinasas o el proteasoma.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) de melanocitos (M330) (panel superior) y células SBcl2 (panel inferior). Se trataron las células con 1 mM DMOG durante 24 h y se incubó el MC con 100 ng de PEDF humano recombinante (rhPEDF) y 20 mM EDTA durante 2 h a 37° C. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF<sub>e</sub> en MC de células SBcl2 tratadas con 10 μM GM6001 tanto en normoxia (21% O<sub>2</sub>) como en hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 h. (c) Análisis por *Western blot* de PEDF<sub>e</sub> en MC y HIF1α en extractos totales de células SBcl2 y WM164 tratadas con MG132 (5 μM y 1 μM respectivamente) en normoxia e hipoxia durante 16 h. Se usó β-tubulina como control de carga.

### 2.3.5. La disminución de los niveles de proteína de PEDF en hipoxia es debida a un proceso de degradación vía autofagia

La autofagia es un proceso en el que parte del material de la célula es degradado en los lisosomas con el fin de mantener la homeostasis celular y facilitar su adaptación en situaciones adversas (Levine and Kroemer, 2008). Es un mecanismo implicado en supervivencia, diferenciación y proliferación, y que paradójicamente también se activa en contextos de muerte celular y parada de proliferación como

## Resultados

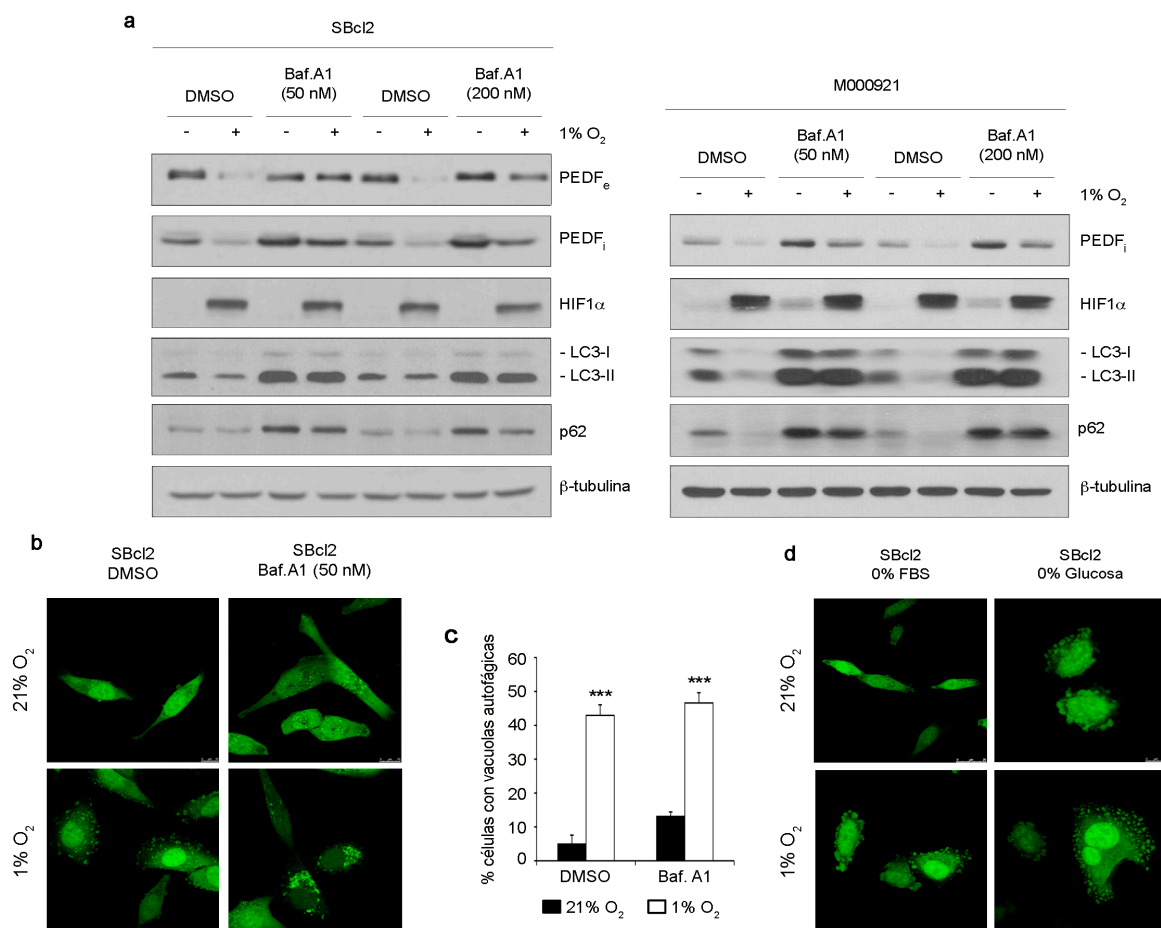
apoptosis y senescencia, respectivamente (Levine and Kroemer, 2008). Su amplia implicación funcional está asociada a un estricto control de su activación en la célula (Levine and Kroemer, 2008; Mizushima *et al.*, 2008). Recientemente se ha descrito su activación en situaciones de bajos niveles de oxígeno (Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Pursiheimo *et al.*, 2009).

Entre las diferentes proteínas implicadas en esta vía degradativa, la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3) ha sido comúnmente utilizada como marcador de la respuesta autofágica (Kabeya *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2004). LC3 es una proteína que presenta dos isoformas: LC3-I (18 kDa) localizada en el citosol y su derivado proteolítico LC3-II (16 kDa) que sufre una modificación por conjugación con una fosfatidiletanolamina que permite su unión a la membrana de los autofagosomas. Por otro lado, la reducción en los niveles de proteína del sequestrina 1 (SQSTM1/p62) ha sido también utilizado como marcador de la activación de la respuesta autofágica en hipoxia (Pursiheimo *et al.*, 2009).

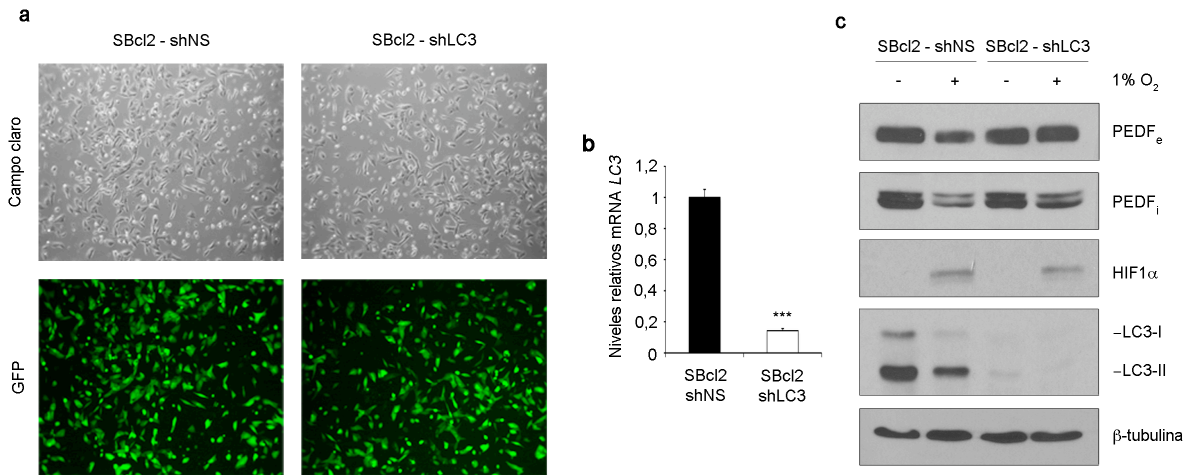
Teniendo en cuenta estos antecedentes, quisimos analizar si en hipoxia la reducción de los niveles de proteína de PEDF era debida a un proceso de degradación vía autofagia. En primer lugar confirmamos el descenso de los niveles de LC3-II y p62 en hipoxia en las líneas de melanoma SBcl2 y M000921 como marcadores de autofagia (Figura 37a). La cuantificación de las vacuolas autofágicas en la línea de melanoma SBcl2 mostró un incremento significativo en hipoxia (\*\*\*,  $P < 0,001$ ) con respecto a la normoxia (Figura 37c). Como control adicional comprobamos que en condiciones de isquemia (simulado mediante deprivación de glucosa) encontramos un patrón de acumulación y distribución de GFP-LC3 similar al observado en hipoxia en la línea SBcl2 (Figura 37d).

A continuación, para estudiar de forma directa la implicación de la autofagia en la regulación de PEDF en hipoxia, tratamos las células con bafilomicina A1 (Baf. A1) que inhibe la ATPasa vacuolar e impide la fusión de los autofagosomas a los lisosomas (Yamamoto *et al.*, 1998). Como esperábamos, el análisis por *Western blot* reveló que el tratamiento con Baf. A1 en las líneas de melanoma SBcl2 y M000921 produjo una acumulación de los niveles LC3-II y p62 (Figura 37a) y una redistribución de la señal de GFP-LC3 en el citoplasma, que pasa de ser uniforme (normoxia) a presentar un patrón en forma de puntos, indicativo de la acumulación de vacuolas autofágicas (Figura 37b-c). Sorprendentemente, la inhibición de la vía autofágica por Baf. A1 bloqueó eficientemente la bajada en hipoxia de los niveles de proteína de PEDF tanto extracelular como intracelular (Figura 37a).

El resultado obtenido mediante el tratamiento con la Baf.A1 también lo confirmamos mediante el silenciamiento de LC3 en la línea de melanoma SBcl2. Tras conseguir una eficiente interferencia de LC3 usando un shRNA<sup>mir</sup> específico (Figura 38a-b) comprobamos que en las células SBcl2-shLC3 conseguíamos bloquear la bajada de PEDF en hipoxia observada en las células control SBcl2-shNS (Figura 38c).



**Figura 37. La autofagia reduce los niveles de PEDF en hipoxia en líneas de melanoma.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y de PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>), HIF1 $\alpha$ , LC3 (I y II) y p62 en extractos totales de las líneas de melanoma SBcl2 (panel izquierdo) y M000921 (panel derecho) tratadas con el inhibidor Baf. A1 (50 nM y 200 nM) o su vehículo (DMSO) en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 h. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga. (b) Imágenes de fluorescencia (63x aumentos) de la redistribución de la proteína GFP-LC3 en la línea SBcl2 tratada con 50 nM de Baf.A1 en normoxia e hipoxia durante 24 h. (c) Cuantificación de células SBcl2 que presentan vacuolas autofágicas tras el tratamiento durante 24 h de Baf. A1 en normoxia (barras negras) e hipoxia (barras blancas). Se contaron diez campos por condición. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (*P*) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*\*, *P*<0,001). (d) Imágenes de fluorescencia (63x aumentos) de la redistribución de la proteína GFP-LC3 en las células SBcl2 crecidas en ausencia de factores de crecimiento (0% FBS) ó en condiciones de isquemia (0% glucosa) en normoxia o hipoxia durante 24 h.



**Figura 38. La interferencia de LC3 en la línea de melanoma SBcl2 inhibe el descenso de los niveles de proteína de PEDF en hipoxia.** (a) Eficiencia de la transducción de la línea de melanoma SBcl2 después de la infección con el lentivirus control (shNS) o el shRNA<sup>mir</sup> específico para LC3 a una multiplicidad de infección (MOI) de 60. Las imágenes de fluorescencia (10x aumentos) muestran un porcentaje de células GFP positivas superior al 90%. (b) RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de LC3 en las líneas de melanoma SBcl2-shNS y SBcl2-shLC3. Los niveles de mRNA de LC3 se muestran relativos a la línea SBcl2-shNS tras la normalización por *18s rRNA*. Las barras representan media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad ( $P$ ) del test de Student (\*\*\*,  $P < 0,001$ ). (c) Análisis por *Western blot* de los niveles de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en el medio condicionado (MC) y de PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>), HIF1α y LC3 en extractos totales de las líneas SBcl2-shNS y SBcl2-shLC3 incubadas en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) durante 24 h. Se usó β-tubulina como control de carga.

Con todos estos resultados podemos concluir que la hipoxia es un entorno permisivo para la pérdida de expresión de PEDF en melanocitos y células de melanoma. De tal forma que en una lesión maligna, la aparición de núcleos hipóxicos estaría promoviendo la degradación de PEDF por autofagia, lo que facilitaría la adquisición de características angiogénicas, invasivas y metastásicas por parte de las células de melanoma.

## **DISCUSIÓN**



El melanoma es uno de los cánceres más agresivos y letales que existen. Aunque el diagnóstico precoz facilita su tratamiento mediante resección quirúrgica, las terapias utilizadas actualmente son bastante ineficaces cuando el melanoma progresa a estadios metastáticos (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Debido a que la clasificación del melanoma basada exclusivamente en criterios histopatológicos no siempre resulta fiable en el diagnóstico de la lesión, se hace imprescindible la identificación de nuevos marcadores moleculares que permitan realizar una clasificación más inequívoca del tumor, así como el desarrollo de nuevas estrategias para su tratamiento (Soengas and Lowe, 2003)

Desde hace unos años, son varios los grupos que han descrito el potencial anti-tumoral de PEDF en diferentes tipos de cánceres y más concretamente en el melanoma, donde nuestro laboratorio describió la acción dual de PEDF tanto sobre las células del microentorno como en las propias células del tumor (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007).

Más recientemente, en un estudio previo del laboratorio observamos que PEDF se expresa en los melanocitos que forman parte del estrato basal de la epidermis, y que su expresión disminuye durante su progresión maligna del melanoma, estando presente únicamente en aquellas líneas caracterizadas molecularmente como no invasivas (Orgaz *et al.*, 2009). Asimismo comprobamos mediante sistemas lentivirales que la pérdida de expresión de PEDF conlleva la adquisición de características más agresivas por parte de las células del melanoma, lo que promueve la formación de metástasis en modelos de ratón (Orgaz *et al.*, 2009).

En este trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos estudiar la expresión de PEDF en biopsias que abarcasen todos los estadios histopatológicos del melanoma humano, así como determinar aquellos mecanismos que pudieran estar implicados en la regulación de la expresión de PEDF durante la progresión maligna del melanoma.

## **1. La expresión de PEDF disminuye en la progresión maligna del melanoma. Estudio en biopsias de melanoma humano.**

Los datos obtenidos previamente en el laboratorio sobre la expresión de PEDF durante la progresión maligna del melanoma humano son el resultado de un trabajo realizado principalmente *in vitro* en un conjunto de líneas celulares clasificadas según su perfil de expresión génica; que fue validado posteriormente *in vivo* en una pequeña colección de biopsias humanas de metástasis de melanoma en nódulo linfático y piel (Orgaz *et al.*, 2009).

Con el objetivo de consolidar estos resultados *in vivo*, analizamos el patrón de expresión de PEDF en cada uno de los estadios que forman parte del desarrollo del melanoma humano. Para ello, utilizamos *Tissue Microarrays* (TMA) correspondientes a *naevus* benigno, melanoma en fase de crecimiento radial (RGP), melanoma en fase de crecimiento vertical (VGP), metástasis cutánea, ganglionar y visceral.

Observamos que únicamente un tercio de los *naevi* mostraban expresión de baja intensidad para PEDF, hecho que contrastaba con el drástico incremento de biopsias de melanoma primario positivas para PEDF y el posterior descenso de su expresión en metástasis. Este resultado se comprobó también analizando los niveles de mRNA de *PEDF* en una colección de biopsias humanas de *naevus*, melanoma primario y metástasis cutánea y ganglionar. Al igual que en los TMA, es en el melanoma primario donde detectamos mayor número de muestras con altos niveles del mRNA de *PEDF* acompañado también de un descenso significativo en metástasis.

En el análisis mediante inmunohistoquímica de los TMA no sólo observamos una tendencia a la disminución de los niveles de PEDF durante la progresión del melanoma, sino que también se puso de manifiesto la heterogeneidad de expresión de este factor en las lesiones humanas. Comprobamos que en aquellas muestras consideradas positivas para PEDF, independientemente del estadio de la progresión en el que estuviera clasificada, no todas las células del tumor presentaban tinción para PEDF. Este resultado puede ser reflejo de la coexistencia de células con diferente grado de agresividad en una misma lesión. Según el modelo del *phenotype switching* (Hoek *et al.*, 2008) sería consecuencia de la alternancia de células de perfil proliferativo (alta expresión de PEDF) y células de perfil invasivo (bajos niveles de PEDF) durante la progresión del melanoma.

Cada una de las biopsias utilizadas en este estudio había sido clasificada de acuerdo a criterios histopatológicos que determinan la agresividad de la lesión según su capacidad para invadir la dermis, la presencia o ausencia de ulceración y el grosor de la lesión (Espesor de Breslow) (Fecher *et al.*, 2007). Sin embargo, ya se ha comentado anteriormente que la clasificación de las lesiones en función de estos criterios patológicos no siempre refleja la agresividad de la lesión, ya que frecuentemente se encuentran melanomas con un grosor muy pequeño que desarrollan metástasis rápidamente, mientras que un porcentaje significativo de lesiones de grosor elevado no metastatizan (Lomuto *et al.*, 2004; Slingluff *et al.*, 1988). Por ese motivo, para el estudio *in vitro* de la expresión PEDF en melanoma se utilizó el modelo del *phenotype switching* de clasificación del melanoma, estableciéndose una correlación directa entre pérdida de expresión de PEDF y adquisición de capacidad invasiva y migratoria; ambos marcadores de agresividad en el melanoma (Orgaz *et al.*, 2009).

Aunque observamos un descenso de los niveles de expresión de PEDF en las biopsias caracterizadas histopatológicamente como agresivas, si tenemos en cuenta la heterogeneidad de expresión de PEDF en las biopsias y los datos previos en líneas celulares, haría falta realizar un perfil de expresión génica de cada una de las biopsias y clasificarlas de acuerdo a su huella molecular en cohortes proliferativo ó invasivo para poder establecer una correcta correlación *in vivo* de la expresión de PEDF con agresividad. Es entonces cuando el análisis de la expresión de PEDF en cada una de las muestras de melanoma humano permitiría establecer una correlación inequívoca entre PEDF y agresividad de la lesión.

A falta de este análisis molecular de las biopsias, en los últimos años se han identificado diferentes marcadores de invasión y transición epitelio-mesénquima (EMT) que permiten una



caracterización más óptima de la agresividad del melanoma. En este sentido, el grupo de JL Rodríguez-Peralto y colaboradores identificó mediante análisis de expresión génica e inmunohistoquímica el aumento de expresión de los marcadores de agresividad/invasión N-cadherina, osteopontina (SPARC) y osteonectina en muestras de melanoma VGP que desarrollaron metástasis con respecto a aquellos melanomas VGP que no metastatizaron (Alonso *et al.*, 2007). El estudio de la expresión de estos marcadores junto con PEDF podría ser útil para determinar si las células más invasivas dentro del tumor, que mostrarían marcaje para alguno de estos marcadores, son además negativas para PEDF, explicando así la heterogeneidad en la expresión de PEDF en las biopsias.

La observación de la expresión de PEDF en líneas de melanoma clasificadas dentro del perfil proliferativo (Orgaz *et al.*, 2009) nos llevó a preguntarnos si en las biopsias del melanoma podría existir una correlación entre proliferación y PEDF. El análisis mediante inmunohistoquímica del marcador de proliferación Ki67 reveló que las diferencias en el índice proliferativo de los estadios histopatológicos del melanoma son moderadas, probablemente debido a la alta heterogeneidad de las lesiones y a la dificultad de clasificación del melanoma. Además, no observamos correlación de la expresión de PEDF y del índice proliferativo en el conjunto de biopsias analizadas. La realización de una doble inmunohistoquímica para PEDF y Ki67 sería necesaria para concluir con más solidez en relación a la correlación entre niveles de PEDF e índice proliferativo en las biopsias de melanoma.

Sin embargo, sí que observamos una correlación directa entre índice de proliferación y expresión de PEDF en la transición entre *naevus* y melanoma RGP. Aunque inicialmente consideramos al *naevus* como un posible control positivo de expresión de PEDF debido a que son lesiones formadas por melanocitos, que expresan altos niveles de PEDF, comprobamos tanto a nivel de proteína como de mRNA que su expresión era muy inferior a la detectada en cualquier estadio del melanoma. El análisis con Ki67 y el marcador de supresión tumoral p16<sup>INK4A</sup> no sólo reveló la parada proliferativa de los *naevi*, sino también una correlación positiva entre PEDF y proliferación al comparar las muestras de *naevus* y melanoma RGP.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión de PEDF en biopsias de melanoma humano corroboran los datos previos resultado del estudio en líneas celulares (Orgaz *et al.*, 2009). La ausencia de expresión de PEDF en lesiones benignas no proliferativas como el *naevus* y su significativo incremento en muestras de melanoma RGP indican la importancia de PEDF en las fases iniciales del desarrollo del melanoma, donde las células del tumor adquieren una ventaja proliferativa y de supervivencia. Durante la progresión del melanoma, no sólo observamos un descenso en los niveles de PEDF en la transición de melanoma RGP a melanoma VGP, fase en la que comienza a adquirir características más agresivas (invasividad y capacidad metastásica) (Chin, 2003), sino que también detectamos un descenso de expresión de PEDF en metástasis. Los niveles remanentes de PEDF observados dentro del grupo de metástasis podrían ser reflejo del proceso de reprogramación al que pudiera estar sometido este factor como consecuencia de la transición de las células invasivas que llegan al órgano diana (baja expresión de PEDF) a células con mayor capacidad proliferativa (alta

expresión de PEDF), que permiten el crecimiento de la lesión una vez que las células de melanoma se han adaptado al nuevo microentorno en el tejido colonizado.

## 2. Identificación de factores reguladores de la expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma humano.

### 2.1. Pérdida de expresión de PEDF en el *naevus*. Implicación de la senescencia inducida por oncogenes (OIS).

Utilizando cultivos primarios se demostró previamente en el laboratorio que los melanocitos de piel humana expresaban niveles elevados de PEDF (Orgaz *et al.*, 2009). Sin embargo, al realizar el análisis de expresión de PEDF en biopsias humanas durante la progresión del melanoma observamos que en *naevi* benignos, los niveles de PEDF eran significativamente más bajos que los detectados en cualquiera de las lesiones del melanoma. Este resultado nos llevó a preguntarnos qué característica presentaban estos *naevi* para mostrar niveles tan bajos de PEDF.

Se ha descrito que los melanocitos de los *naevi* presentan mutaciones en la vía de las MAPK que promueven la proliferación celular con posterior entrada en senescencia como protección por parte de la célula para evitar la transformación tumoral (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). De tal forma que estas lesiones senescentes, con mutaciones principalmente en *BRAF* (*BRAF*<sup>V600E</sup>) y en *NRAS* (*NRAS*<sup>Q61L</sup>), pueden permanecer latentes durante largos periodos de tiempo (Bennett, 2003; Pollock *et al.*, 2003), siendo necesario nuevas alteraciones oncogénicas que promuevan la transformación maligna del melanocito.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los datos de expresión de PEDF en biopsias, nos planteamos la posibilidad de que la senescencia fuera la responsable del descenso de PEDF en las muestras de *naevus*. Para explorar esta hipótesis, sobre-expresamos *HRAS* mutado (*HRAS*<sup>G12V</sup>) en cultivos primarios de melanocitos mediante sistemas lentivirales. Mutaciones en el gen *HRAS* son más frecuentes en el *naevus* de Spitz (Denoyelle *et al.*, 2006), donde los melanocitos presentan una morfología muy similar a la de las células de melanoma, lo que dificulta notablemente el diagnóstico de la lesión. Esta morfología es debida en parte a la diferencias existentes entre la senescencia inducida por mutaciones en *BRAF* ó en *RAS* (tanto *NRAS* como *HRAS*), que originan en los melanocitos fenotipos muy diferentes en periodos de tiempo también distintos (Denoyelle *et al.*, 2006; Zhuang *et al.*, 2008). En nuestro análisis utilizamos *HRAS*<sup>G12V</sup> porque la inducción de senescencia en las células es más rápida y está asociada a un cambio muy significativo y característico en la morfología de los melanocitos.

La sobre-expresión de *HRAS*<sup>G12V</sup> en cultivos primarios de melanocitos supuso la adquisición en pocos días de un fenotipo senescente acompañado de parada proliferativa e inducción de marcadores de parada la ciclo celular como p16<sup>INK4A</sup>. Observamos un descenso en los niveles de mRNA de *PEDF*

acompañado también con bajada de proteína PEDF tanto intracelular como extracelular. Junto con los melanocitos, los fibroblastos son el otro tipo celular de la piel que expresa niveles elevados de PEDF (Orgaz *et al.*, 2009), además de tratarse del modelo más utilizado en el estudio de la inducción de senescencia por oncogenes (Lin *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998). Al igual que en melanocitos, la sobre-expresión de HRAS<sup>G12V</sup> en este tipo celular supuso un marcado descenso en los niveles de mRNA y proteína de PEDF.

Inicialmente también se describió a PEDF como EPC-1 (*early population doubling cDNA-1*), ya que se observó que su expresión en cultivos primarios de fibroblastos se perdía en las sucesivas divisiones celulares cuando el cultivo entraba en un estado de parada proliferativa por senescencia (Pignolo *et al.*, 1993). Este resultado apoyaría los datos obtenidos en fibroblastos de descenso de PEDF por senescencia.

En resultados preliminares no mostrados en esta Tesis Doctoral encontramos además que en fibroblastos, el descenso de PEDF por senescencia inducida por HRAS<sup>G12V</sup> es un proceso independiente de p16<sup>INK4A</sup> y p53. A pesar de que las vías de p16<sup>INK4A</sup>/pRB y p53 son consideradas como los principales reguladores de la entrada en senescencia, se ha observado que su participación en este mecanismo de defensa no siempre es necesaria. En cultivos primarios de melanocitos, la entrada en senescencia por mutaciones en *KRAS* es un proceso independiente de p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup> (Haferkamp *et al.*, 2009), lo que coincide con la observación encontrada en *naevi* con BRAF<sup>V600E</sup>, donde no todas las células que mostraban tinción para SA-β-Gal presentaban también marcaje para p16<sup>INK4A</sup> (Michaloglou *et al.*, 2005). A su vez, modelos *in vivo* de ratones transgénicos para BRAF<sup>V600E</sup> y p16<sup>INK4A</sup> KO no sólo desarrollaban melanomas sino que también presentaban *naevi* dispersos por la piel (Dhomen *et al.*, 2009). Estos resultados parecen indicar la existencia de mecanismos alternativos que promueven la entrada en senescencia por inducción de oncogenes. En este sentido, el grupo de M. Soengas y colaboradores publicó un trabajo realizado en melanocitos y biopsias de *naevus* donde describían que la entrada en senescencia por parte de HRAS<sup>G12V</sup> estaba mediada por la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*) asociada a estrés del retículo endoplasmático (ER) (Denoyelle *et al.*, 2006).

Existen antecedentes que describen la implicación de mutaciones en los genes *BRAF* y *RAS* en la bajada de expresión de PEDF. En un trabajo donde se realizó análisis de expresión génica global de biopsias de *naevi* con y sin mutaciones en *BRAF* (BRAF<sup>V600E</sup>), se observó un descenso significativo en el mRNA de *PEDF* en los *naevi* que cursaban con mutaciones en *BRAF* (Bloethner *et al.*, 2007). Sin embargo, en un análisis realizado en nuestro laboratorio de datos de microarrays de líneas celulares de melanoma no se observó correlación entre los niveles de expresión de PEDF y las mutaciones en *BRAF* ó *NRAS*. A su vez, en un trabajo realizado en fibroblastos adultos deficientes en VEGF, la sobre-expresión de HRAS<sup>G12V</sup> supuso un descenso en el mRNA de *PEDF* y *TSP-1*, aumentando la angiogénesis de los fibrosarcomas (Viloria-Petit *et al.*, 2003). Por último, también se ha observado un

descenso significativo de los niveles de mRNA de *PEDF* en muestras de cáncer colorrectal que presentaban mutaciones oncogénicas en *KRAS* (Diaz *et al.*, 2008).

El hecho de que observemos un aumento de expresión de PEDF en los melanomas RGP, que siguen manteniendo mutaciones en *BRAF* ó *RAS*, parece indicar que la expresión de PEDF supone una ventaja proliferativa y/o de supervivencia para las células de melanoma en las primeras etapas del desarrollo de este tipo de lesiones tumorales.

La inducción de senescencia por *HRAS*<sup>G12V</sup> en melanocitos también produjo un descenso en los niveles de mRNA de *MITF*, gen de vital importancia implicado en la regulación de la biología del melanocito y del melanoma (Levy *et al.*, 2006). Este resultado corroboraría datos previos de trabajos en los que se describe la relación inversa entre senescencia y MITF. En melanocitos muy diferenciados por estimulación prolongada de la vía cAMP (tanto por el uso de tirosinasa como de la toxina del cólera) produce la entrada en senescencia por parte de las células que conlleva un descenso de los niveles de proteína de MITF (Schwahn *et al.*, 2001; 2005). A su vez, son varios los grupos que describen *in vivo* el descenso de MITF en lesiones senescentes, tanto en *naevi* benignos (Carreira *et al.*, 2006; Garraway *et al.*, 2005) como en *naevi* de Spitz con mutaciones en *HRAS* (Maldonado *et al.*, 2004). Por último, el silenciamiento de MITF mediante estrategias de RNA de interferencia en melanomas y melanocitos supuso un aumento en la expresión de marcadores de senescencia y en el número de células teñidas para SA- $\beta$ -Gal (Giuliano *et al.*, 2010; Strub *et al.*, 2011).

### **2.2. Reprogramación de PEDF en la progresión maligna del melanoma. Influencia de MITF y del microentorno en su regulación.**

El modelo del *phenotype switching* de progresión del melanoma identifica firmas de expresión molecular que permiten la clasificación de las líneas celulares de melanoma en dos grupos principales: un cohorte con alta capacidad proliferativa y bajo potencial invasivo (perfil proliferativo); y otro cohorte poco proliferativo, pero altamente invasivo (perfil invasivo) (Hoek *et al.*, 2006).

Entre los genes caracterizados dentro de cada uno de los perfiles de expresión génica, el factor de transcripción asociado a microftalmia ó MITF es un regulador clave de la alternancia entre el fenotipo del perfil proliferativo, que presenta niveles elevados de MITF, y el de perfil invasivo, caracterizado por bajos niveles de expresión de este factor. El análisis de PEDF en una colección de líneas de melanoma mostró un patrón de expresión similar al encontrado en MITF, con niveles elevados en el cohorte de líneas celulares con perfil proliferativo y pérdida de expresión en el cohorte de las líneas con perfil invasivo (Orgaz *et al.*, 2009). A su vez, los ensayos funcionales de interferencia de PEDF en líneas de perfil proliferativo mostraron un incremento en migración e invasión (Orgaz *et al.*, 2009), características similares a las encontradas por el silenciamiento de MITF (Carreira *et al.*, 2006; Cheli *et al.*, 2011b). Aunque se exploró la posibilidad de que MITF fuera el responsable de los efectos

funcionales en migración e invasión de PEDF en las células de melanoma, no se observaron cambios significativos en los niveles de MITF al silenciar PEDF (Orgaz *et al.*, 2009).

Partiendo de estos resultados, en este trabajo de Tesis Doctoral consideramos la posibilidad de que este *loop* de regulación estuviera invertido, siendo MITF un regulador de PEDF, estando ambos implicados en el control de la migración e invasión.

Como primera aproximación, el estudio *in vivo* de los niveles de mRNA de *MITF* y *PEDF* reveló una correlación significativa entre ambos marcadores en biopsias correspondientes a todos los estadios del desarrollo del melanoma humano. Al comparar los niveles de expresión de PEDF en las líneas celulares y en las biopsias humanas observamos que las líneas de melanoma presentaban niveles más altos de PEDF que los encontrados en las biopsias. Como se ha comentado en la introducción, entre las múltiples funciones de PEDF está la de promover la supervivencia frente a diferentes estímulos en diversos tipos celulares del sistema nervioso (Bilak *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1999; DeCoster *et al.*, 1999; Ogata *et al.*, 2001). Es probable que durante el establecimiento de las líneas celulares a partir de biopsias, PEDF pudiera estar actuando como un factor de protección y supervivencia, favoreciendo el crecimiento de aquellas líneas que presentan mayor expresión de PEDF.

A continuación observamos que el silenciamiento de MITF mediante sistemas de RNA de interferencia en diferentes líneas de melanoma clasificadas dentro del perfil proliferativo (alto MITF y PEDF) supuso un descenso significativo en los niveles de PEDF tanto a nivel de mRNA como de proteína. Estos resultados identifican a MITF como un regulador de PEDF en el melanoma. Por otra parte, detectamos una correlación directa en el RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) de *MITF* y *PEDF* en una colección de líneas de melanoma pertenecientes a los cohortes tanto proliferativo como invasivo. Además, los resultados obtenidos por el grupo de I. Davidson y colaboradores, junto con el análisis informático que realizamos del locus *SERPINF1* nos reveló la existencia de tres sitios putativos de unión de MITF en el primer intrón de *PEDF*. A falta de futuros estudios de confirmación, en conjunto estos resultados sugieren el papel de MITF como un regulador transcripcional directo de PEDF en la progresión del melanoma. Sin embargo, encontramos niveles remanentes de hnRNA de *PEDF* en líneas de melanoma de perfil invasivo con ausencia de expresión de hnRNA de MITF, lo que parece indicar la existencia de mecanismos post-transcripcionales adicionales que pudieran estar participando en la regulación de PEDF.

La identificación del factor de transcripción MITF como un regulador de la expresión de PEDF en melanoma permite establecer una posible explicación de la reprogramación que sufre PEDF durante el desarrollo maligno del melanoma.

Han sido varios los grupos que han descrito las diversas funciones de MITF tanto en el melanocito como en células de melanoma. Sin embargo, el descubrimiento en estos trabajos de efectos funcionales opuestos por parte de MITF hacía difícil identificar el papel que jugaba este gen en la progresión del melanoma. Para unificar criterios, el grupo de C. Goding propuso un modelo de reostato donde las diferencias en la expresión de este factor determinan sus efectos funcionales

(Carreira *et al.*, 2006). De esta forma, encontramos que el melanocito presenta niveles elevados de MITF donde promueve la diferenciación de las células además de su parada proliferativa, y donde podría estar manteniendo a su vez niveles altos de expresión de PEDF. Una vez nos encontramos dentro del melanoma, se ha visto que la expresión de MITF es heterogénea en melanomas primarios, con una tendencia a la pérdida de expresión en biopsias de metástasis, además de observar una correlación inversa entre MITF y agresividad del melanoma (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008). Esta heterogeneidad de expresión es la que encontramos también en PEDF en biopsias de melanoma primario, junto con la tendencia a la pérdida de este factor en metástasis. MITF se expresa en células del perfil proliferativo donde favorecería la proliferación celular y mantendría también la expresión de PEDF. Sin embargo, en células del perfil invasivo la bajada de los niveles de MITF favorece el aumento de la capacidad invasiva y migratoria de las células; funciones que podrían estar mediadas por el descenso de la expresión de PEDF por parte de MITF.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la reprogramación de PEDF del fenotipo proliferativo al invasivo es necesaria para la progresión metastásica del melanoma (Orgaz *et al.*, 2009). Como hemos visto, esta reprogramación entre ambos fenotipos podría estar mediada por MITF, sin embargo, señales procedentes del microentorno tumoral también pueden favorecer cambios bidireccionales en la firma molecular hacia un fenotipo u otro.

En este sentido, el grupo de M. Hendrix y colaboradores ha desarrollado modelos *in vitro* donde se observa el potencial de la matriz extracelular para reprogramar no sólo las células de melanoma sino también los melanocitos (Hendrix *et al.*, 2007; Postovit *et al.*, 2006). En colaboración con este laboratorio hemos observado que cuando se crecen melanocitos primarios sobre una matriz de colágeno preconditionada por las células de melanoma muy agresivas C8161, estos melanocitos adquieren un fenotipo más invasivo y la expresión de PEDF disminuye aproximadamente nueve veces con respecto a melanocitos crecidos en una matriz control no preconditionada (Seftor *et al.*, 2005). Esta reprogramación, no obstante, es reversible, ya que los melanocitos recuperan su fenotipo y perfil de expresión génica normales tras ser retirados de la matriz preconditionada. Este resultado demuestra el papel tan importante que juega el microentorno en la capacidad de reprogramación de las células de melanoma.

La hipoxia es una de las características del microambiente que está presente en muchos tumores sólidos y que se ha visto que promueve la invasión celular y la formación de metástasis en melanoma (Rofstad *et al.*, 2002). En los últimos años se ha descrito además la implicación de bajos niveles de oxígeno en la transformación maligna de los melanocitos (Bedogni *et al.*, 2005, 2008). Asimismo, encontramos antecedentes que describen la disminución en la expresión de PEDF por hipoxia en células de retinoblastoma (Dawson *et al.*, 1999) y en células RPE (Notari *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes, así como datos previos del laboratorio donde observamos la potente actividad anti-angiogénica de PEDF en el melanoma (Garcia *et al.*, 2004), pensamos que la hipoxia podría estar implicada en la reprogramación de PEDF en la progresión del melanoma, promoviendo su inhibición y

por tanto, favoreciendo la vascularización del tumor y la adquisición de características más agresivas por parte de las células.

Los abordajes realizados tanto en cultivos primarios de melanocitos como en diferentes líneas de melanoma de perfil proliferativo muestran un descenso en proteína intracelular y extracelular de PEDF, manteniendo constante los niveles de mRNA; resultados que coinciden con los descritos previamente en células de retinoblastoma y células RPE. Aunque la ausencia de variación en el mRNA de *PEDF* implica mecanismos de regulación post-transcripcionales, algunas de las moléculas activadas transcripcionalmente por HIF1 $\alpha$  podrían estar regulado a PEDF. Sin embargo, en este trabajo de Tesis Doctoral describimos por primera vez que la regulación de PEDF por hipoxia es un proceso HIF1 $\alpha$  independiente en el linaje melanocítico. En la búsqueda del mecanismo de regulación de PEDF por hipoxia, comprobamos que ni la traducción estaba comprometida, ni la degradación por metaloproteinasas ó proteasoma estaban implicadas. Por el contrario, encontramos que el descenso en proteína de PEDF en hipoxia era debido a una degradación vía autofagia.

La activación de autofagia en regiones hipóxicas de tumores establecidos promueve la supervivencia celular, indicando que las células tumorales necesitan de la función catabólica de la autofagia para tolerar el estrés (Degenhardt *et al.*, 2006). En estas situaciones, la autofagia actuaría como un promotor tumoral no sólo proporcionando substratos energéticos durante largos periodos de ausencia de nutrientes, sino también preservando la función de los orgánulos necesarios para el crecimiento celular (Guo *et al.*, 2011).

En el melanoma se ha descrito que existe una correlación directa entre autofagia y menor tasa de supervivencia de los pacientes (Ma *et al.*, 2011), así como una mayor resistencia a las terapias utilizadas habitualmente en clínica (Romano *et al.*, 2004). La autofagia en el melanoma supone además un activador de la adquisición de características invasivas. Se ha detectado un aumento de autofagia en células de melanoma presentes en la dermis (Lazova *et al.*, 2010) y en tumores que mostraban formación de redes vasculogénicas (*vasculogenic mimicry* (VM)) (Han *et al.*, 2011), lo que demuestra la implicación de la autofagia en la invasión y formación de metástasis por parte de las células de melanoma. Datos previos del laboratorio demuestran además que el silenciamiento de PEDF en líneas de melanoma poco agresivas induce la capacidad de VM en matrices de colágeno (Orgaz *et al.*, 2009). Por último, en un trabajo reciente se ha observado que tumores que cursan con mutaciones en *HRAS* ó *KRAS* requieren de altos niveles de autofagia basal para sobrevivir a situaciones de estrés y promover el crecimiento tumoral (Guo *et al.*, 2011).

Todos estos antecedentes refuerzan la idea de que en el melanoma, donde el 90% de las lesiones presentan mutaciones en la vía de las MAPK, la aparición de regiones hipóxicas dentro del tumor favorece mediante activación de autofagia, la adquisición de un fenotipo más agresivo en donde la inhibición de la expresión de PEDF sería necesaria para aumentar la capacidad invasiva y migratoria de las células de melanoma, así como la vascularización del tumor.

Aunque la autofagia puede suponer una ventaja adaptativa para las células tumorales, también se ha descrito su función como supresor tumoral. En este sentido, en los últimos años se ha demostrado que en la senescencia inducida por oncogenes se produce una activación de autofagia acompañada de una inhibición de la actividad de mTOR (Narita and Young, 2009; White and Lowe, 2009; Yang *et al.*, 2009). Se ha detectado además aumento de expresión de algunos reguladores de autofagia como LC3 y Bnip3L en *naevi* y en neoplasias intra-epiteliales de próstata, modelos *in vivo* de senescencia inducida por oncogenes (Young *et al.*, 2009).

Dado que hemos demostrado que en situaciones de hipoxia los niveles de proteína de PEDF disminuyen debido a una degradación vía autofagia, es tentador preguntarse si en aquellos sistemas donde hemos visto inducción de senescencia por oncogenes (*naevi*, melanocitos y fibroblastos), se produce una activación de autofagia que podría contribuir al descenso de los niveles de proteína de PEDF. Sin embargo la observación del descenso de PEDF tanto a nivel de proteína como de mRNA nos hace considerar a la autofagia como una posible vía de regulación complementaria a un mecanismo de regulación transcripcional adicional.

Ya hemos comentado que tanto en melanocitos senescentes como en los *naevi* los niveles de MITF disminuyen drásticamente. Viendo que MITF podría considerarse como un regulador transcripcional directo de PEDF, cabría pensar que el descenso de MITF en lesiones senescentes melanocíticas supusiera también un descenso en el mRNA de *PEDF*, y donde la autofagia cooperaría en la degradación de la proteína de PEDF. Sin embargo, el hecho de que encontremos también la regulación negativa de PEDF en fibroblastos senescentes parece indicar que si MITF estuviera realmente regulando a PEDF en senescencia, sería un mecanismo limitado a los melanocitos, por lo que se haría necesario la identificación de mecanismos adicionales de regulación de PEDF en senescencia que pudieran aplicarse a diversos tipos celulares.

### 3. Regulación de PEDF durante la progresión maligna del melanoma

Los diversos abordajes utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral nos han permitido identificar diferentes mecanismos de regulación de PEDF que podrían explicar las diferencias de expresión encontradas tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* en los diferentes estadios de la progresión maligna del melanoma humano. De tal forma que estos reguladores nos permiten plantear un modelo de reprogramación de PEDF en el melanoma (Figura 39).

En un contexto puramente fisiológico, PEDF se expresa en los melanocitos de la piel donde ayudaría a restringir su capacidad migratoria y la vascularización de la piel. Estos melanocitos pueden sufrir mutaciones en la vía de las MAPK que promueven inicialmente una proliferación masiva seguida de entrada en senescencia como mecanismo para evitar la transformación maligna de las células. El resultado es una lesión benigna que puede permanecer en estado de latencia durante largos periodos de tiempo (*naevus*) en la que encontramos que la expresión de PEDF disminuye. En estas



células, la regulación negativa de PEDF podría ser debida a la acción conjunta de MITF, cuyo descenso inhibiría transcripcionalmente a PEDF, y a la activación de la autofagia en senescencia, que podría estar degradando la proteína de PEDF.

La regulación de PEDF que encontramos en los *naevi* y células senescentes nos hace preguntarnos por qué se hace necesaria la inhibición de este factor en senescencia. Podríamos pensar que dado que PEDF se expresa en células de melanoma del perfil proliferativo, este factor pudiera estar implicado en la regulación de la proliferación celular. Sin embargo, en los estudios de interferencia realizados en líneas de melanoma, a pesar de que el silenciamiento de PEDF aumentaba significativamente el potencial migratorio y la capacidad invasiva de las células, no encontramos diferencias significativas en la proliferación de las células de melanoma (Orgaz *et al.*, 2009). También cabe la posibilidad que al igual que en células del sistema nervioso, PEDF esté actuando como un factor de supervivencia necesario para las células de melanoma, expresándose a niveles altos en los melanomas RGP. Por otra parte, se ha descrito que en lesiones donde se produce una senescencia inducida por oncogenes, durante la transición entre la fase proliferativa de las células y la entrada en senescencia se produce un incremento en la secreción de numerosas citoquinas, entre las que encontramos a IL6 e IL8, que podrían estar ayudando a establecer la parada proliferativa (Kuilman *et al.*, 2008). En un trabajo previo del laboratorio, encontramos que la sobre-expresión de PEDF en la línea de melanoma A375 supuso un descenso del mRNA de *IL8* con respecto a las células control (Orgaz *et al.*, 2011). Aunque son sistemas diferentes, podríamos pensar que PEDF pudiera estar colaborando en la regulación de la expresión de IL8, donde el descenso de los niveles de PEDF en los *naevi* supondría un aumento en la secreción de esta citoquina.

Dado que mutaciones en *BRAF* ó *RAS* no son suficientes para la transformación maligna del melanocito, en el caso de la formación del melanoma a partir del *naevus*, son necesarias alteraciones génicas adicionales que promuevan la salida de senescencia y la adquisición del fenotipo maligno. Muy habitual, sobre todo en los melanomas familiares, es la pérdida de función del locus *CDKN2A*, que codifica para p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup>, inhibidores del ciclo celular (Miller and Mihm, 2006). También se ha identificado a *MYC* como un oncogén que facilita el escape de la senescencia en melanomas (Zhuang *et al.*, 2008), así como mutaciones con pérdida de función del supresor tumoral *PTEN* (Vredeveld *et al.*, 2012) ó la sobre-expresión de los factores de transcripción T-box (Tbx2 y Tbx3), que actúan inhibiendo a p21<sup>CIP1</sup> (Bennett, 2008). Por último, también se ha observado que MITF puede actuar como un oncogen específico del linaje melanocítico, cuya colaboración con BRAF<sup>V600E</sup> favorece la transformación del melanocito (Garraway *et al.*, 2005). Este aumento en la expresión de MITF en los primeros estadios del desarrollo del melanoma podría explicar también el aumento de expresión de PEDF en melanomas primarios, formados principalmente por células del perfil proliferativo.

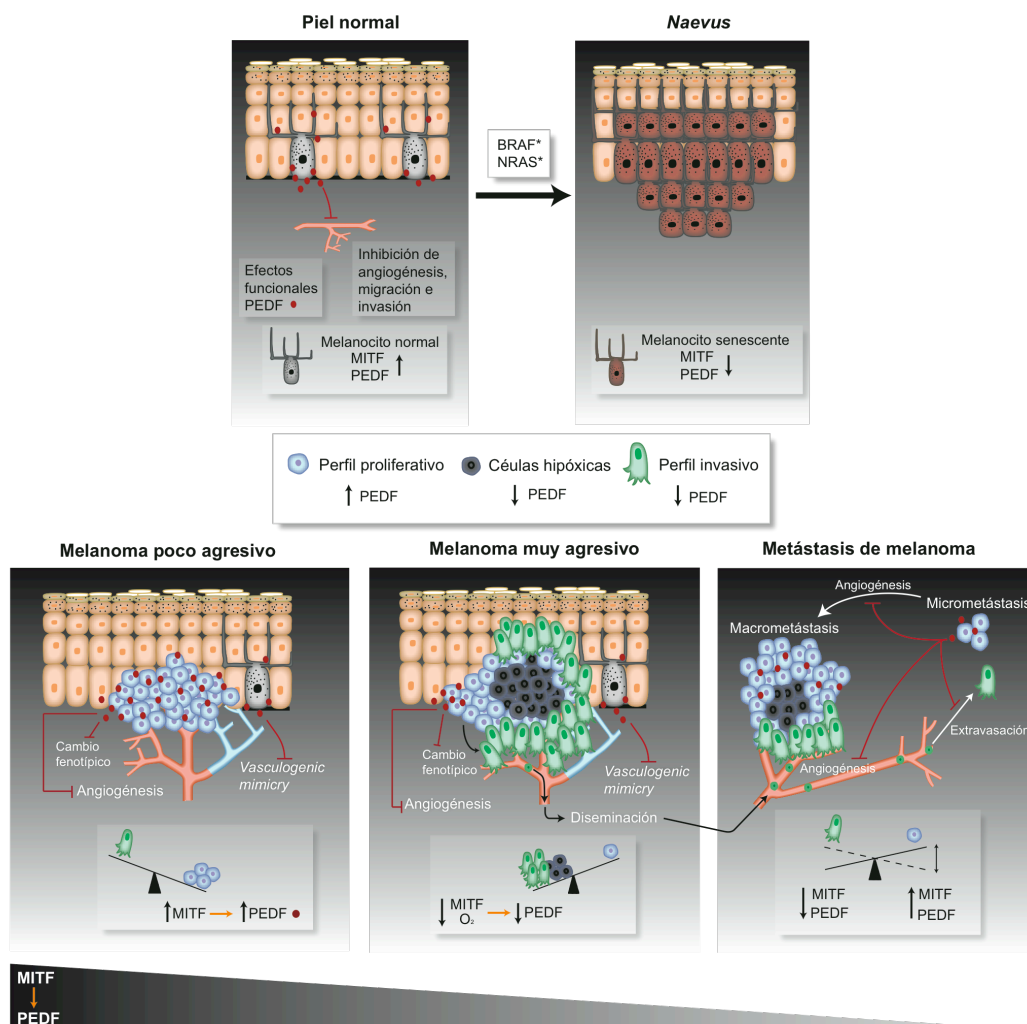
Una vez dentro del melanoma primario, donde las células de perfil proliferativo con alta expresión de MITF y PEDF promueven el crecimiento del tumor, pueden surgir regiones hipóxicas

que inducen la vascularización del tumor y favorecen la adquisición de un fenotipo más agresivo (Xia *et al.*, 2009). Para tal fin, la hipoxia no sólo reduce los niveles de mRNA de *MITF* aumentando la expresión de marcadores de transición epitelio mesénquima (EMT) (Cheli *et al.*, 2011b; Feige *et al.*, 2011); sino que además inhibe la expresión de PEDF mediante degradación por autofagia de sus niveles de proteína, lo que supone el aumento del potencial angiogénico, de la capacidad invasiva y migratoria de estas células de perfil invasivo, además de aumentar su capacidad de VM; características requeridas para el proceso de formación de metástasis. En estas lesiones metastásicas, algunas células de fenotipo invasivo pueden reprogramarse por las señales del nuevo microentorno hacia células de fenotipo proliferativo originando macrometástasis, donde volverían a repetirse ciclos adicionales de reprogramación de MITF y PEDF. Este proceso de reprogramaciones da como resultado una lesión con expresión heterogénea de MITF y PEDF donde encontraríamos un equilibrio entre células tanto de perfil proliferativo (alto MITF y PEDF) con células de perfil invasivo (bajo MITF y PEDF) (Figura 39).

Un dato que sorprende es el papel dual de la autofagia, que actúa como supresor tumoral en los *naevi*, mientras que en las lesiones malignas promueve la supervivencia de las células del tumor. Esto puede ser debido a que la senescencia inducida por oncogenes es un evento muy temprano en el proceso tumoral y supone un paso crucial en la supresión del desarrollo del tumor. En este punto, la autofagia estaría contribuyendo al mantenimiento del fenotipo senescente, ejerciendo por tanto un papel supresor. Sin embargo, si las células tumorales consiguen escapar del estado de senescencia, la autofagia supondría una ventaja adaptativa para las células del tumor, ya que estaría contribuyendo a sobrevivir al estrés metabólico, facilitando su transformación y contribuyendo a la resistencia a los quimioterápicos. De tal forma que es importante interpretar el papel que juega la autofagia en el contexto del estado en el que se encuentre la lesión.

En los últimos años han surgido varios estudios en los que se demuestra la existencia de células dentro del tumor calificadas como “iniciadoras tumorales” o *cancer stem cells* (CSCs), caracterizadas por un crecimiento lento, pero con alto potencial de división y capacidad tumorogénica (Dalerba and Clarke, 2007). La heterogeneidad que observamos en el melanoma, donde se detectan poblaciones con huellas moleculares y características funcionales diferentes, puede ser debida a: (i) un modelo jerárquico basado en la existencia de CSCs y su progenie (células de crecimiento rápido), ó alternativamente a (ii) un modelo dinámico basado en la reprogramación reversible entre células con fenotipo *stem* y células diferenciadas (Hoek and Goding, 2010), siendo este último un modelo que conciliaría el modelo del *phenotype switching* y el de las CSCs. Apoyando esta última teoría nos encontramos el trabajo realizado en melanoma por SJ. Morrison y colaboradores donde observan que tumores originados a partir de células CD133<sup>-</sup> ó CD133<sup>+</sup> muestran una heterogeneidad de expresión con células de ambos marcadores (Quintana *et al.*, 2008). Asimismo, el grupo de M. Herlyn y colaboradores describió la expresión diferencial de la demetilasa de la histona 3 (H3K4) JARID1B en poblaciones de melanoma. Observó que las células JARID1B<sup>+</sup> mostraban características *stem*, con

crecimiento lento y gran agresividad, al contrario que las células JARID1B<sup>-</sup>. Sin embargo, la expresión de JARID1B fluctúa, mostrando que células JARID1B<sup>+</sup> pueden originarse a partir de células JARID1B<sup>-</sup> y viceversa (Roesch *et al.*, 2010). Estos estudios demuestran que el mantenimiento del tumor debe ser visto como un proceso dinámico mediado temporalmente por poblaciones diferentes dentro del tumor (Clevers, 2011).



**Figura 39. Modelo de regulación de PEDF en la progresión maligna del melanoma.** En la piel normal, los melanocitos cutáneos expresan niveles elevados de MITF y PEDF, donde este último contribuye a restringir la capacidad migratoria e invasiva. Mutaciones en *BRAF* ó *NRAS* en los melanocitos promueven la proliferación de las células seguida de la entrada a un estado de senescencia donde disminuyen los niveles tanto de MITF como de PEDF. Alteraciones oncogénicas adicionales promueven la transformación maligna de los melanocitos, originando un melanoma primario de baja agresividad. Este melanoma está formado principalmente por células de perfil proliferativo, con altos niveles de MITF y PEDF. En estas células, PEDF restringe sus propiedades migratorias e invasivas, el potencial angiogénico y la capacidad de formar redes vasculogénicas (*vasculogenic mimicry*), limitando la progresión de la lesión primaria. Sin embargo, el crecimiento masivo del tumor da lugar a la aparición de regiones hipóxicas que favorecen la adquisición de características invasivas. En estas células de fenotipo invasivo, se produce una pérdida de expresión de MITF, acompañada también de una degradación de PEDF a nivel de proteína mediada por la autofagia. El descenso en estas células de PEDF contribuye a la adquisición de las propiedades funcionales necesarias para la cascada metastásica. La formación de micrometástasis de melanoma en órganos distantes requiere una nueva reprogramación desde el fenotipo invasivo al proliferativo que suponga un aumento de expresión de PEDF. En estas lesiones encontraríamos células tanto del perfil proliferativo como del invasivo, razón por la cual la expresión de PEDF en melanomas primarios y en metástasis de melanoma es heterogénea.

En un trabajo publicado recientemente se describe que el silenciamiento temporal de MITF en células de melanoma supone no sólo el aumento del tamaño del tumor sino también la expresión de marcadores *stem* como *OCT4* y *NANOG*. Describen que esta población MITF<sup>-</sup>, existe espontáneamente en los tumores y que es necesaria para la formación del tumor (Cheli *et al.*, 2011a). Además, la población MITF<sup>-</sup> muestra características similares a las encontradas en la población JARID1B<sup>+</sup>, aunque faltaría por demostrar si se trata de la misma población.

Dada la correlación inversa encontrada entre la expresión de PEDF y la agresividad del melanoma (Orgaz *et al.*, 2009), así como la identificación de MITF como un posible regulador transcripcional directo de PEDF, sería muy interesante analizar los niveles de PEDF en estas poblaciones con características *stem*, donde cabría esperar un descenso en su expresión, dado que son células de alta agresividad y MITF<sup>-</sup>. Apoyando esta hipótesis encontramos que en resultados no mostrados en esta Tesis Doctoral, la población de células madre de la piel que se localizan en la región del *bulge* del folículo, y que dará lugar a melanocitos diferenciados presentes tanto en el bulbo piloso como en la epidermis (Lin and Fisher, 2007), no muestra expresión para PEDF.

Aunque en este trabajo de Tesis Doctoral hemos identificado algunos de los posibles mecanismos de regulación de PEDF durante la progresión maligna del melanoma, deben existir reguladores adicionales que promuevan no sólo la pérdida de expresión de PEDF en la transición de células de perfil proliferativo al invasivo, sino su re-expresión en metástasis a partir de células con características invasivas.

Muchos tipos de cáncer presentan mutaciones en *p53*, sin embargo, la mayoría de las lesiones de melanoma mantienen este gen supresor intacto. Por el contrario, sí que presentan mutaciones que producen el silenciamiento de esta vía (Goding, 2011), como por ejemplo la sobre-expresión de los factores de transcripción T-box, *Tbx2* y *Tbx3* (Bennett, 2008). Se ha descrito en células de cáncer colorrectal que PEDF es una diana directa de *p63* y *p73*, dos miembros de la familia de *p53* (Sasaki *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que la isoforma TA-*p73* inhibe el crecimiento independiente de anclaje a través de la activación de la proteína *KCNK1*, cuya expresión disminuye en el melanoma con respecto a la piel normal (Beitzinger *et al.*, 2008), por lo que sería interesante explorar si *p73* está implicado en la regulación de la expresión de PEDF durante la progresión del melanoma.

Partiendo de los resultados que indican una regulación directa de PEDF por MITF, podríamos pensar en la posibilidad de que factores reguladores de MITF estuvieran también implicados en el control de la expresión de PEDF. Entre ellos encontramos al factor del crecimiento transformante beta (*TGF-β*), cuya expresión está aumentada en las líneas celulares de fenotipo invasivo con baja expresión de MITF (Hoek *et al.*, 2006). Asimismo, se ha visto que la señalización por *TGF-β* inhibe la expresión de MITF y es crítica para la generación y mantenimiento de las células madre melanocíticas (Nishimura *et al.*, 2010). Se ha observado también que la vía de Notch está constitutivamente activa en

melanomas donde colabora en la transformación maligna de los melanocitos (Pinnix *et al.*, 2009), promoviendo en situaciones de hipoxia adquisición de características invasivas (Bedogni *et al.*, 2008).

En conclusión, observamos que la expresión heterogénea de PEDF durante la progresión maligna del melanoma es debido a un proceso de reprogramación regulado no sólo por alteraciones génicas sino también por señales provenientes del microentorno tumoral. Sin embargo, es necesario seguir explorando posibles mecanismos reguladores de PEDF en el melanoma para poder entender mejor las acciones específicas de este factor tanto en los melanocitos como en las células de melanoma.



## **CONCLUSIONES**





1. En biopsias que comprenden los diferentes estadios del melanoma humano, los *naevi* intradérmicos presentan niveles de expresión de PEDF más bajos que los observados en las lesiones de melanoma primario y metástasis de melanoma. Existe una correlación directa entre el índice de proliferación y expresión de PEDF al comparar biopsias de *naevus* y melanoma RGP.

2. Durante la progresión maligna del melanoma encontramos una disminución de la expresión de PEDF asociada a un aumento de la malignidad. Los melanomas RGP son los que presentan mayor expresión de PEDF, mientras que sus niveles descienden en melanomas VGP y metástasis de melanoma, donde las células adquieren características más agresivas.

3. La sobre-expresión de *HRAS* oncogénico ( $HRAS^{G12V}$ ) en fibroblastos y melanocitos primarios provoca la pérdida de expresión de PEDF tanto a nivel de mRNA como de proteína, asociada a la entrada en senescencia de las células. La regulación negativa de PEDF inducida por senescencia podría ser responsable de los bajos niveles de expresión de PEDF detectados en las biopsias de *naevus* intradérmico.

4. Existe una correlación directa entre los niveles de expresión de mRNA del factor de transcripción asociado a microftalmia (*MITF*) y *PEDF* en líneas celulares de melanoma y biopsias de melanoma humano.

5. El silenciamiento de la expresión de *MITF* en una colección de líneas de melanoma poco agresivas que expresan niveles elevados de PEDF, conduce a un descenso en los niveles de mRNA y proteína de PEDF. Este resultado junto con la correlación observada entre *MITF* y PEDF en biopsias y líneas de melanoma demuestran el papel de *MITF* como regulador de PEDF en la progresión del melanoma.

6. El estudio del RNA heterogéneo nuclear (hnRNA) de *MITF* y *PEDF* en una colección de líneas de melanoma, junto con el análisis de datos públicos de sitios de unión genómicos (Strub *et al.*, 2011) de *MITF* dentro del gen de PEDF (*SERPINF1*) sugieren el papel de *MITF* como un regulador transcripcional directo de PEDF en el melanoma.

7. En cultivos primarios de melanocitos y líneas de melanoma poco agresivas que expresan niveles elevados de PEDF, la hipoxia regula negativamente los niveles de proteína de PEDF a través de un proceso HIF1 $\alpha$  independiente.

8. La regulación negativa de PEDF en hipoxia en melanocitos y células de melanoma es debida a un mecanismo post-traducciona mediado por degradación vía autofagia, cuya actividad está aumentada en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abe R., Shimizu T., Yamagishi S., Shibaki A., Amano S., Inagaki Y., Watanabe H., Sugawara H., Nakamura H., Takeuchi M., Imaizumi T., & Shimizu H. (2004). Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol* **164**: 1225-32.
- Abramson LP., Stellmach V., Doll JA., Cornwell M., Arensman RM., & Crawford SE. (2003). Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg* **38**: 336-42; discussion 336-42.
- Abul-Hassan K., Walmsley R., Tombran-Tink J., & Boulton M. (2000). Regulation of tyrosinase expression and activity in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Pigment Cell Res* **13**: 436-41.
- Aita VM., Liang XH., Murty VV., Pincus DL., Yu W., Cayanis E., Kalachikov S., Gilliam TC., & Levine B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**: 59-65.
- Alaluf S., Muir-Howie H., Hu HL., Evans A., & Green MR. (2000). Atmospheric oxygen accelerates the induction of a post-mitotic phenotype in human dermal fibroblasts: the key protective role of glutathione. *Differentiation* **66**: 147-55.
- Alberdi E., Hyde CC., & Becerra SP. (1998). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site. *Biochemistry* **37**: 10643-52.
- Alberdi E., Aymerich MS., & Becerra SP. (1999). Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* **274**: 31605-12.
- Alonso SR., Ortiz P., Pollan M., Perez-Gomez B., Sanchez L., Acuna MJ., Pajares R., Martinez-Tello FJ., Hortelano CM., Piris MA., & Rodriguez-Peralto JL. (2004). Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* **164**: 193-203.
- Alonso SR., Tracey L., Ortiz P., Perez-Gomez B., Palacios J., Pollan M., Linares J., Serrano S., Saez-Castillo AI., Sanchez L., Pajares R., Sanchez-Aguilera A., Artiga MJ., Piris MA., & Rodriguez-Peralto JL. (2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* **67**: 3450-60.
- Andreu-Agullo C., Morante-Redolat JM., Delgado AC., & Farinas I. (2009). Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* **12**: 1514-23.
- Aymerich MS., Alberdi EM., Martinez A., & Becerra SP. (2001). Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 3287-93.
- Balch CM., Soong SJ., Gershenwald JE., Thompson JF., Reintgen DS., Cascinelli N., Urist M., McMasters KM., Ross MI., Kirkwood JM., Atkins MB., Thompson JA., Coit DG., Byrd D., Desmond R., Zhang Y., Liu PY., Lyman GH., & Morabito A. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* **19**: 3622-34.
- Balin AK., & Pratt L. (2002). Oxygen modulates the growth of skin fibroblasts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**: 305-10.
- Banerjee SS., & Harris M. (2000). Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology* **36**: 387-402.
- Bansal R., & Nikiforov MA. (2010). Pathways of oncogene-induced senescence in human melanocytic cells. *Cell Cycle* **9**: 2782-8.
- Bar-Eli M. (1999). Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* **67**: 12-8.
- Barnstable CJ., & Tombran-Tink J. (2004). Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* **23**: 561-77.
- Bauer J., Curtin JA., Pinkel D., & Bastian BC. (2007). Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol* **127**: 179-82.
- Becerra SP., Perez-Mediavilla LA., Weldon JE., Locatelli-Hoops S., Senanayake P., Notari L., Notario V., & Hollyfield JG. (2008). Pigment epithelium-derived factor binds to hyaluronan. Mapping of a hyaluronan binding site. *J Biol Chem* **283**: 33310-20.
- Becerra SP., Sagasti A., Spinella P., & Notario V. (1995). Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J Biol Chem* **270**: 25992-9.
- Bedogni B., Welford SM., Cassarino DS., Nickoloff BJ., Giaccia AJ., & Powell MB. (2005). The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* **8**: 443-54.

- Bedogni B., Warneke JA., Nickoloff BJ., Giaccia AJ., & Powell MB. (2008). Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. *J Clin Invest* **118**: 3660-70.
- Bedogni B., & Powell MB. (2009). Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**: 166-74.
- Beitzinger M., Hofmann L., Oswald C., Beinoraviciute-Kellner R., Sauer M., Griesmann H., Bretz AC., Burek C., Rosenwald A., & Stiewe T. (2008). p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *EMBO J* **27**: 792-803.
- Bejar J., Hong Y., & Scharf M. (2003). Mitf expression is sufficient to direct differentiation of medaka blastula derived stem cells to melanocytes. *Development* **130**: 6545-53.
- Bennett DC. (2003). Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* **22**: 3063-9.
- Bennett DC. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 27-38.
- Berger MF., Hodis E., Heffernan TP., Deribe YL., Lawrence MS., Protopopov A., Ivanova E., Watson IR., Nickerson E., Ghosh P., Zhang H., Zeid R., Ren X., Cibulskis K., Sivachenko AY., Wagle N., Sucker A., Sougnez C., Onofrio R., Ambrogio L., Auclair D., Fennell T., Carter SL., Drier Y., Stojanov P., Singer MA., Voet D., Jing R., Saksena G., Barretina J., Ramos AH., Pugh TJ., Stransky N., Parkin M., Winckler W., Mahan S., Ardlie K., Baldwin J., Wargo J., Schadendorf D., Meyerson M., Gabriel SB., Golub TR., Wagner SN., Lander ES., Getz G., Chin L., & Garraway LA. (2012). Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* **485**: 502-6.
- Bernard A., Gao-Li J., Franco CA., Bouceba T., Huet A., & Li Z. (2009). Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* **284**: 10480-90.
- Bilak MM., Corse AM., Bilak SR., Lehar M., Tombran-Tink J., & Kunc L RW. (1999). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 719-28.
- Bittner M., Meltzer P., Chen Y., Jiang Y., Seftor E., Hendrix M., Radmacher M., Simon R., Yakhini Z., Ben-Dor A., Sampas N., Dougherty E., Wang E., Marincola F., Gooden C., Lueders J., Glatfelter A., Pollock P., Carpten J., Gillanders E., Leja D., Dietrich K., Beaudry C., Berens M., Alberts D., & Sondak V. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* **406**: 536-40.
- Bloethner S., Snellman E., Bermejo JL., Hiripi E., Gast A., Thirumaran RK., Wellenreuther R., Hemminki K., & Kumar R. (2007). Differential gene expression in melanocytic nevi with the V600E BRAF mutation. *Genes Chromosomes Cancer* **46**: 1019-27.
- Bouck N. (2002). PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* **8**: 330-4.
- Brennan CM., & Steitz JA. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* **58**: 266-77.
- Campisi J., & d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 729-40.
- Cao W., Tombran-Tink J., Chen W., Mrazek D., Elias R., & McGinnis JF. (1999). Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* **57**: 789-800.
- Carreira S., Goodall J., Denat L., Rodriguez M., Nuciforo P., Hoek KS., Testori A., Larue L., & Goding CR. (2006). Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* **20**: 3426-39.
- Carreira S., Liu B., & Goding CR. (2000). The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem* **275**: 21920-7.
- Chang C., & Werb Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* **11**: S37-43.
- Chang K., Elledge SJ., & Hannon GJ. (2006). Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nat Methods* **3**: 707-14.
- Cheli Y., Ohanna M., Ballotti R., & Bertolotto C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**: 27-40.

- Cheli Y., Giuliano S., Botton T., Rocchi S., Hofman V., Hofman P., Bahadoran P., Bertolotto C., & Ballotti R. (2011a). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* **30**: 2307-18.
- Cheli Y., Giuliano S., Fenouille N., Allegra M., Hofman V., Hofman P., Bahadoran P., Lacour JP., Tartare-Deckert S., Bertolotto C., & Ballotti R. (2011b). Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene*.
- Chen JL., Lin HH., Kim KJ., Lin A., Forman HJ., & Ann DK. (2008). Novel roles for protein kinase Cdelta-dependent signaling pathways in acute hypoxic stress-induced autophagy. *J Biol Chem* **283**: 34432-44.
- Chen JL., Lin HH., Kim KJ., Lin A., Ou JH., & Ann DK. (2009). PKC delta signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis. *Autophagy* **5**: 244-6.
- Chi A., Valencia JC., Hu ZZ., Watabe H., Yamaguchi H., Mangini NJ., Huang H., Canfield VA., Cheng KC., Yang F., Abe R., Yamagishi S., Shabanowitz J., Hering VJ., Wu C., Appella E., & Hunt DF. (2006). Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* **5**: 3135-44.
- Chin L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* **3**: 559-70.
- Chin L., Garraway LA., & Fisher DE. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* **20**: 2149-82.
- Clark WH, Jr. (1991). Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev* **10**: 83-8.
- Clevers H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**: 313-9.
- Cohen C., Zavala-Pompa A., Sequeira JH., Shoji M., Sexton DG., Cotsonis G., Cerimele F., Govindarajan B., Macaron N., & Arbiser JL. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* **8**: 3728-33.
- Crawford SE., Stellmach V., Ranalli M., Huang X., Huang L., Volpert O., De Vries GH., Abramson LP., & Bouck N. (2001). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* **114**: 4421-8.
- Cummins DL., Cummins JM., Pantle H., Silverman MA., Leonard AL., & Chanmugam A. (2006). Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* **81**: 500-7.
- Dalerba P., & Clarke MF. (2007). Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory. *Cell Stem Cell* **1**: 241-2.
- Davies H., Bignell GR., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett MJ., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson BA., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins GJ., Bigner DD., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho JW., Leung SY., Yuen ST., Weber BL., Seigler HF., Darrow TL., Paterson H., Marais R., Marshall CJ., Wooster R., Stratton MR., & Futreal PA. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-54.
- Dawson DW., Volpert OV., Gillis P., Crawford SE., Xu H., Benedict W., & Bouck NP. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**: 245-8.
- DeCoster MA., Schabelman E., Tombran-Tink J., & Bazan NG. (1999). Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **56**: 604-10.
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee C., Shi Y., Gelinas C., Fan Y., Nelson DA., Jin S., & White E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**: 51-64.
- Denoyelle C., Abou-Rjaily G., Bezrookove V., Verhaegen M., Johnson TM., Fullen DR., Pointer JN., Gruber SB., Su LD., Nikiforov MA., Kaufman RJ., Bastian BC., & Soengas MS. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* **8**: 1053-63.
- Dhomen N., Reis-Filho JS., da Rocha Dias S., Hayward R., Savage K., Delmas V., Larue L., Pritchard C., & Marais R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* **15**: 294-303.

## Bibliografia

- Diaz R., Pena C., Silva J., Lorenzo Y., Garcia V., Garcia JM., Sanchez A., Espinosa P., Yuste R., Bonilla F., & Dominguez G. (2008). p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer* **123**: 1060-7.
- Doll JA., Stellmach VM., Bouck NP., Bergh AR., Lee C., Abramson LP., Cornwell ML., Pins MR., Borensztajn J., & Crawford SE. (2003). Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* **9**: 774-80.
- Du J., Widlund HR., Horstmann MA., Ramaswamy S., Ross K., Huber WE., Nishimura EK., Golub TR., & Fisher DE. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* **6**: 565-76.
- DuBridge RB., Tang P., Hsia HC., Leong PM., Miller JH., & Calos MP. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**: 379-87.
- Ek ET., Dass CR., & Choong PF. (2006). Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* **5**: 1641-6.
- Eskelinen EL. (2011). The dual role of autophagy in cancer. *Curr Opin Pharmacol* **11**: 294-300.
- Evans SM., Schrlau AE., Chalian AA., Zhang P., & Koch CJ. (2006). Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol* **126**: 2596-606.
- Fecher LA., Cummings SD., Keefe MJ., & Alani RM. (2007). Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* **25**: 1606-20.
- Feige E., Yokoyama S., Levy C., Khaled M., Igras V., Lin RJ., Lee S., Widlund HR., Granter SR., Kung AL., & Fisher DE. (2011). Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E924-33.
- Fernández-Barral A., Orgaz JL., & Jiménez B. (2011). Pigment epithelium-derived factor – An angiostatic factor with a broader function in melanoma. In: Yohei Tanaka editor. Breakthroughs in melanoma Research. Ed: INTECH. pp. 143-170.
- Fernandez-Garcia NI., Volpert OV., & Jimenez B. (2007). Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* **85**: 15-22.
- Filleur S., Volz K., Nelius T., Mirochnik Y., Huang H., Zaichuk TA., Aymerich MS., Becerra SP., Yap R., Veliceasa D., Shroff EH., & Volpert OV. (2005). Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res* **65**: 5144-52.
- Filleur S., Nelius T., de Riese W., & Kennedy RC. (2009). Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem* **106**: 769-75.
- Fitzpatrick TB., & Breathnach AS. (1963). [the Epidermal Melanin Unit System]. *Dermatol Wochenschr* **147**: 481-9.
- Francis MK., Appel S., Meyer C., Balin SJ., Balin AK., & Cristofalo VJ. (2004). Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging in vivo. *J Invest Dermatol* **122**: 1096-105.
- Fung C., Lock R., Gao S., Salas E., & Debnath J. (2008). Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* **19**: 797-806.
- Galban S., Kuwano Y., Pullmann R, Jr., Martindale JL., Kim HH., Lal A., Abdelmohsen K., Yang X., Dang Y., Liu JO., Lewis SM., Holcik M., & Gorospe M. (2008). RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* **28**: 93-107.
- Garcia M., Fernandez-Garcia NI., Rivas V., Carretero M., Escamez MJ., Gonzalez-Martin A., Medrano EE., Volpert O., Jorcano JL., Jimenez B., Larcher F., & Del Rio M. (2004). Inhibition of xenografted human melanoma growth and prevention of metastasis development by dual antiangiogenic/antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Res* **64**: 5632-42.
- Garcia-Lopez MA., Barreiro O., Garcia-Diez A., Sanchez-Madrid F., & Penas PF. (2005). Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility. *J Invest Dermatol* **125**: 1001-9.
- Garraway LA., Widlund HR., Rubin MA., Getz G., Berger AJ., Ramaswamy S., Beroukhi R., Milner DA., Granter SR., Du J., Lee C., Wagner SN., Li C., Golub TR., Rimm DL., Meyerson ML., Fisher DE., & Sellers WR. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**: 117-22.



- Garraway LA., & Sellers WR. (2006). From integrated genomics to tumor lineage dependency. *Cancer Res* **66**: 2506-8.
- Giuliano S., Cheli Y., Ohanna M., Bonet C., Beuret L., Bille K., Loubat A., Hofman V., Hofman P., Ponzio G., Bahadoran P., Ballotti R., & Bertolotto C. (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res* **70**: 3813-22.
- Giuliano S., Ohanna M., Ballotti R., & Bertolotto C. (2011). Advances in melanoma senescence and potential clinical application. *Pigment Cell Melanoma Res* **24**: 295-308.
- Goding CR. (2011). Commentary. A picture of Mitf in melanoma immortality. *Oncogene* **30**: 2304-6.
- Goeman F., Thormeyer D., Abad M., Serrano M., Schmidt O., Palmero I., & Baniahmad A. (2005). Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Mol Cell Biol* **25**: 422-431.
- Goodall J., Carreira S., Denat L., Kobi D., Davidson I., Nuciforo P., Sturm RA., Larue L., & Goding CR. (2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res* **68**: 7788-94.
- Gray-Schopfer V., Wellbrock C., & Marais R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**: 851-7.
- Guan M., Yam HF., Su B., Chan KP., Pang CP., Liu WW., Zhang WZ., & Lu Y. (2003). Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol* **56**: 277-82.
- Guo JY., Chen HY., Mathew R., Fan J., Strohecker AM., Karsli-Uzunbas G., Kamphorst JJ., Chen G., Lemons JM., Karantza V., Collier HA., Dipaola RS., Gelinas C., Rabinowitz JD., & White E. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* **25**: 460-70.
- Haass NK., Smalley KS., Li L., & Herlyn M. (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* **18**: 150-9.
- Haferkamp S., Scurr LL., Becker TM., Frausto M., Kefford RF., & Rizos H. (2009). Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. *J Invest Dermatol* **129**: 1983-91.
- Han C., Sun B., Wang W., Cai W., Lou D., Sun Y., & Zhao X. (2011). Overexpression of microtubule-associated protein-1 light chain 3 is associated with melanoma metastasis and vasculogenic mimicry. *Tohoku J Exp Med* **223**: 243-51.
- Haqq C., Nosrati M., Sudilovsky D., Crothers J., Khodabakhsh D., Pulliam BL., Federman S., Miller JR, 3rd., Allen RE., Singer MI., Leong SP., Ljung BM., Sagebiel RW., & Kashani-Sabet M. (2005). The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6092-7.
- Hayward NK. (2003). Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* **22**: 3053-62.
- Hendrix MJ., Seftor EA., Hess AR., & Seftor RE. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* **3**: 411-21.
- Hendrix MJ., Seftor EA., Seftor RE., Kasemeier-Kulesa J., Kulesa PM., & Postovit LM. (2007). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* **7**: 246-55.
- Herlyn D., Iliopoulos D., Jensen PJ., Parmiter A., Baird J., Hotta H., Adachi K., Ross AH., Jambrosic J., Koprowski H., & et al. (1990). In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice. *Cancer Res* **50**: 2296-302.
- Hersey P., & Zhang XD. (2008). Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 358-67.
- Hirota K., & Semenza GL. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* **59**: 15-26.
- Hoek KS., Schlegel NC., Brafford P., Sucker A., Ugurel S., Kumar R., Weber BL., Nathanson KL., Phillips DJ., Herlyn M., Schadendorf D., & Dummer R. (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* **19**: 290-302.
- Hoek KS. (2007). DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment Cell Res* **20**: 466-84.
- Hoek KS., Eichhoff OM., Schlegel NC., Dobbeling U., Kobert N., Schaerer L., Hemmi S., & Dummer R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **68**: 650-6.

- Hoek KS., & Goding CR. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**: 746-59.
- Hoyer-Hansen M., Bastholm L., Szyniarowski P., Campanella M., Szabadkai G., Farkas T., Bianchi K., Fehrenbacher N., Elling F., Rizzuto R., Mathiasen IS., & Jaattela M. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* **25**: 193-205.
- Hsu MY., Meier F., & Herlyn M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**: 522-36.
- Juhász I., Albelda SM., Elder DE., Murphy GF., Adachi K., Herlyn D., Valyi-Nagy IT., & Herlyn M. (1993). Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* **143**: 528-37.
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., & Yoshimori T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**: 5720-8.
- Kabeya Y., Mizushima N., Yamamoto A., Oshitani-Okamoto S., Ohsumi Y., & Yoshimori T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**: 2805-12.
- Karantzà-Wadsworth V., Patel S., Kravchuk O., Chen G., Mathew R., Jin S., & White E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* **21**: 1621-35.
- Karashima T., Sweeney P., Kamat A., Huang S., Kim SJ., Bar-Eli M., McConkey DJ., & Dinney CP. (2003). Nuclear factor-kappaB mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8. *Clin Cancer Res* **9**: 2786-97.
- Keene JD. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8**: 533-43.
- Kessenbrock K., Plaks V., & Werb Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**: 52-67.
- Kozaki K., Miyaishi O., Koiwai O., Yasui Y., Kashiwai A., Nishikawa Y., Shimizu S., & Saga S. (1998). Isolation, purification, and characterization of a collagen-associated serpin, caspin, produced by murine colon adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* **273**: 15125-30.
- Kraemer KH., & Greene MH. (1985). Dysplastic nevus syndrome. Familial and sporadic precursors of cutaneous melanoma. *Dermatol Clin* **3**: 225-37.
- Krishnamachary B., Berg-Dixon S., Kelly B., Agani F., Feldser D., Ferreira G., Iyer N., LaRusch J., Pak B., Taghavi P., & Semenza GL. (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **63**: 1138-43.
- Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld LC., Douma S., van Doorn R., Desmet CJ., Aarden LA., Mooi WJ., & Peeper DS. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**: 1019-31.
- Ladhani O., Sanchez-Martinez C., Orgaz JL., Jimenez B., & Volpert OV. (2011). Pigment epithelium-derived factor blocks tumor extravasation by suppressing amoeboid morphology and mesenchymal proteolysis. *Neoplasia* **13**: 633-42.
- Lartigau E., Randrianarivelo H., Avril MF., Margulis A., Spatz A., Eschwege F., & Guichard M. (1997). Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma. *Melanoma Res* **7**: 400-6.
- Lawrence DA., Strandberg L., Ericson J., & Ny T. (1990). Structure-function studies of the SERPIN plasminogen activator inhibitor type 1. Analysis of chimeric strained loop mutants. *J Biol Chem* **265**: 20293-301.
- Lazova R., Klump V., & Pawelek J. (2010). Autophagy in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* **37**: 256-68.
- Ledda F., Bravo AI., Adris S., Bover L., Mordoh J., & Podhajcer OL. (1997). The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* **108**: 210-4.
- Levene A. (1980). On the histological diagnosis and prognosis of malignant melanoma. *J Clin Pathol* **33**: 101-24.
- Levine B., & Kroemer G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27-42.
- Levy C., Khaled M., & Fisher DE. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* **12**: 406-14.

- Li G., Satyamoorthy K., & Herlyn M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**: 3819-25.
- Liang XH., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H., & Levine B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-6.
- Lin AW., Barradas M., Stone JC., van Aelst L., Serrano M., & Lowe SW. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **12**: 3008-19.
- Lin JY., & Fisher DE. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**: 843-50.
- Loercher AE., Tank EM., Delston RB., & Harbour JW. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol* **168**: 35-40.
- Lomuto M., Calabrese P., & Giuliani A. (2004). Prognostic signs in melanoma: state of the art. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **18**: 291-300.
- Lopez de Silanes I., Zhan M., Lal A., Yang X., & Gorospe M. (2004). Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2987-92.
- Lopez de Silanes I., Galban S., Martindale JL., Yang X., Mazan-Mamczarz K., Indig FE., Falco G., Zhan M., & Gorospe M. (2005). Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* **25**: 9520-31.
- Ma XH., Piao S., Wang D., McAfee QW., Nathanson KL., Lum JJ., Li LZ., & Amaravadi RK. (2011). Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res* **17**: 3478-89.
- Maiuri MC., Le Toumelin G., Criollo A., Rain JC., Gautier F., Juin P., Tasdemir E., Pierron G., Troulinaki K., Tavernarakis N., Hickman JA., Geneste O., & Kroemer G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* **26**: 2527-39.
- Malchiodi-Albedi F., Feher J., Caiazza S., Formisano G., Perilli R., Falchi M., Petrucci TC., Scorcio G., & Tombran-Tink J. (1998). PEDF (pigment epithelium-derived factor) promotes increase and maturation of pigment granules in pigment epithelial cells in neonatal albino rat retinal cultures. *Int J Dev Neurosci* **16**: 423-32.
- Maldonado JL., Timmerman L., Fridlyand J., & Bastian BC. (2004). Mechanisms of cell-cycle arrest in Spitz nevi with constitutive activation of the MAP-kinase pathway. *Am J Pathol* **164**: 1783-7.
- Marino ML., Fais S., Djavaheri-Mergny M., Villa A., Meschini S., Lozupone F., Venturi G., Della Mina P., Pattingre S., Rivoltini L., Codogno P., & De Milito A. (2010). Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. *Cell Death Dis* **1**: e87.
- Marusyk A., Almendro V., & Polyak K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* **12**: 323-34.
- Mathew R., Kongara S., Beaudoin B., Karp CM., Bray K., Degenhardt K., Chen G., Jin S., & White E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* **21**: 1367-81.
- Meyer C., Notari L., & Becerra SP. (2002). Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* **277**: 45400-7.
- Michaloglou C., Vredeveld LC., Soengas MS., Denoyelle C., Kuilman T., van der Horst CM., Majoor DM., Shay JW., Mooi WJ., & Peeper DS. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**: 720-4.
- Miller AJ., & Mihm MC, Jr. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* **355**: 51-65.
- Minamino T., Mitsialis SA., & Kourembanas S. (2001). Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol Cell Biol* **21**: 3336-42.
- Mirochnik Y., Aurora A., Schulze-Hoepfner FT., Deabes A., Shifrin V., Beckmann R., Polsky C., & Volpert OV. (2009). Short pigment epithelial-derived factor-derived peptide inhibits angiogenesis and tumor growth. *Clin Cancer Res* **15**: 1655-63.
- Mizushima N., Levine B., Cuervo AM., & Klionsky DJ. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-75.

- Narita M., & Young AR. (2009). Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy* **5**: 1046-7.
- Nichols WW., Murphy DG., Cristofalo VJ., Toji LH., Greene AE., & Dwight SA. (1977). Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* **196**: 60-3.
- Nishimura EK., Suzuki M., Igras V., Du J., Lonning S., Miyachi Y., Roes J., Beermann F., & Fisher DE. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* **6**: 130-40.
- Notari L., Miller A., Martinez A., Amaral J., Ju M., Robinson G., Smith LE., & Becerra SP. (2005). Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 2736-47.
- Notari L., Baladron V., Aroca-Aguilar JD., Balko N., Heredia R., Meyer C., Notario PM., Saravanamuthu S., Nueda ML., Sanchez-Sanchez F., Escribano J., Laborda J., & Becerra SP. (2006). Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* **281**: 38022-37.
- Ogata N., Wang L., Jo N., Tombran-Tink J., Takahashi K., Mrazek D., & Matsumura M. (2001). Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res* **22**: 245-52.
- Omholt K., Krockel D., Ringborg U., & Hansson J. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* **16**: 197-200.
- Orgaz JL., Ladhani O., Hoek KS., Fernandez-Barral A., Mihic D., Aguilera O., Seftor EA., Bernad A., Rodriguez-Peralto JL., Hendrix MJ., Volpert OV., & Jimenez B. (2009). 'Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma'. *Oncogene* **28**: 4147-61.
- Orgaz JL., Benguria A., Sanchez-Martinez C., Ladhani O., Volpert OV., & Jimenez B. (2011). Changes in the gene expression profile of A375 human melanoma cells induced by overexpression of multifunctional pigment epithelium-derived factor. *Melanoma Res* **21**: 285-97.
- Ortiz-Barahona A., Villar D., Pescador N., Amigo J., & del Peso L. (2010). Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res* **38**: 2332-45.
- Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang XH., Mizushima N., Packer M., Schneider MD., & Levine B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**: 927-39.
- Pignolo RJ., Cristofalo VJ., & Rotenberg MO. (1993). Senescent WI-38 cells fail to express EPC-1, a gene induced in young cells upon entry into the G0 state. *J Biol Chem* **268**: 8949-57.
- Pinnix CC., Lee JT., Liu ZJ., McDaid R., Balint K., Beverly LJ., Brafford PA., Xiao M., Himes B., Zabierowski SE., Yashiro-Ohtani Y., Nathanson KL., Bengston A., Pollock PM., Weeraratna AT., Nickoloff BJ., Pear WS., Capobianco AJ., & Herlyn M. (2009). Active Notch1 confers a transformed phenotype to primary human melanocytes. *Cancer Res* **69**: 5312-20.
- Pollock PM., Harper UL., Hansen KS., Yudit LM., Stark M., Robbins CM., Moses TY., Hostetter G., Wagner U., Kakareka J., Salem G., Pohida T., Heenan P., Duray P., Kallioniemi O., Hayward NK., Trent JM., & Meltzer PS. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**: 19-20.
- Polsky D., & Cordon-Cardo C. (2003). Oncogenes in melanoma. *Oncogene* **22**: 3087-91.
- Postovit LM., Seftor EA., Seftor RE., & Hendrix MJ. (2006). Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. *Cancer Res* **66**: 7833-6.
- Postovit LM., Margaryan NV., Seftor EA., & Hendrix MJ. (2008). Role of nodal signaling and the microenvironment underlying melanoma plasticity. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 348-57.
- Pouyssegur J., Dayan F., & Mazure NM. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**: 437-43.
- Pumiglia K., & Temple S. (2006). PEDF: bridging neurovascular interactions in the stem cell niche. *Nat Neurosci* **9**: 299-300.
- Punzon I., Criado LM., Serrano A., Serrano F., & Bernad A. (2004). Highly efficient lentiviral-mediated human cytokine transgenesis on the NOD/scid background. *Blood* **103**: 580-2.

- Pursiheimo JP., Rantanen K., Heikkinen PT., Johansen T., & Jaakkola PM. (2009). Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* **28**: 334-44.
- Quintana E., Shackleton M., Sabel MS., Fullen DR., Johnson TM., & Morrison SJ. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**: 593-8.
- Ramirez-Castillejo C., Sanchez-Sanchez F., Andreu-Agullo C., Ferron SR., Aroca-Aguilar JD., Sanchez P., Mira H., Escribano J., & Farinas I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* **9**: 331-9.
- Roesch A., Fukunaga-Kalabis M., Schmidt EC., Zabierowski SE., Brafford PA., Vultur A., Basu D., Gimotty P., Vogt T., & Herlyn M. (2010). A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**: 583-94.
- Rofstad EK., Rasmussen H., Galappathi K., Mathiesen B., Nilsen K., & Graff BA. (2002). Hypoxia promotes lymph node metastasis in human melanoma xenografts by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer Res* **62**: 1847-53.
- Rohwer N., Welzel M., Daskalow K., Pfander D., Wiedenmann B., Detjen K., & Cramer T. (2008). Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin. *Cancer Res* **68**: 10113-20.
- Romano MF., Avellino R., Petrella A., Bisogni R., Romano S., & Venuta S. (2004). Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur J Cancer* **40**: 2829-36.
- Rutkowski DT., & Kaufman RJ. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* **32**: 469-76.
- Sasaki Y., Naishiro Y., Oshima Y., Imai K., Nakamura Y., & Tokino T. (2005). Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* **24**: 5131-6.
- Satyamoorthy K., DeJesus E., Linnenbach AJ., Kraj B., Kornreich DL., Rendle S., Elder DE., & Herlyn M. (1997). Melanoma cell lines from different stages of progression and their biological and molecular analyses. *Melanoma Res* **7 Suppl 2**: S35-42.
- Schwahn DJ., Xu W., Herrin AB., Bales ES., & Medrano EE. (2001). Tyrosine levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte-stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Res* **14**: 32-9.
- Schwahn DJ., Timchenko NA., Shibahara S., & Medrano EE. (2005). Dynamic regulation of the human dopachrome tautomerase promoter by MITF, ER-alpha and chromatin remodelers during proliferation and senescence of human melanocytes. *Pigment Cell Res* **18**: 203-13.
- Scott MC., Wakamatsu K., Ito S., Kadekaro AL., Kobayashi N., Groden J., Kavanagh R., Takakuwa T., Virador V., Hearing VJ., & Abdel-Malek ZA. (2002). Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci* **115**: 2349-55.
- Scurr LL., Pupo GM., Becker TM., Lai K., Schrama D., Haferkamp S., Irvine M., Scolyer RA., Mann GJ., Becker JC., Kefford RF., & Rizos H. (2010). IGFBP7 is not required for B-RAF-induced melanocyte senescence. *Cell* **141**: 717-27.
- Seftor EA., Meltzer PS., Schatteman GC., Gruman LM., Hess AR., Kirschmann DA., Seftor RE., & Hendrix MJ. (2002). Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* **44**: 17-27.
- Seftor EA., Brown KM., Chin L., Kirschmann DA., Wheaton WW., Protopopov A., Feng B., Balagurunathan Y., Trent JM., Nickoloff BJ., Seftor RE., & Hendrix MJ. (2005). Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* **65**: 10164-9.
- Selzer E., Wacheck V., Lucas T., Heere-Ress E., Wu M., Weilbaecher KN., Schlegel W., Valent P., Wrba F., Pehamberger H., Fisher D., & Jansen B. (2002). The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res* **62**: 2098-103.
- Semenza GL., & Wang GL. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**: 5447-54.
- Semenza GL. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* **8**: S62-7.

## Bibliografia

- Serrano M., Lin AW., McCurrach ME., Beach D., & Lowe SW. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593-602.
- Sharma A., Trivedi NR., Zimmerman MA., Tuveson DA., Smith CD., & Robertson GP. (2005). Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* **65**: 2412-21.
- Silva JM., Li MZ., Chang K., Ge W., Golding MC., Rickles RJ., Siolas D., Hu G., Paddison PJ., Schlabach MR., Sheth N., Bradshaw J., Burchard J., Kulkarni A., Cavet G., Sachidanandam R., McCombie WR., Cleary MA., Elledge SJ., & Hannon GJ. (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* **37**: 1281-8.
- Simonovic M., Gettins PG., & Volz K. (2001). Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11131-5.
- Slingluff CL, Jr., Vollmer RT., Reintgen DS., & Seigler HF. (1988). Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg* **208**: 150-61.
- Smit DJ., Gardiner BB., & Sturm RA. (2007). Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer* **121**: 2653-60.
- Soengas MS., & Lowe SW. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**: 3138-51.
- Stahl JM., Sharma A., Cheung M., Zimmerman M., Cheng JQ., Bosenberg MW., Kester M., Sandirasegarane L., & Robertson GP. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* **64**: 7002-10.
- Steele FR., Chader GJ., Johnson LV., & Tombran-Tink J. (1993). Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1526-30.
- Steingrimsson E. (2008). All for one, one for all: alternative promoters and Mitf. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 412-4.
- Stellmach V., Crawford SE., Zhou W., & Bouck N. (2001). Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2593-7.
- Strub T., Giuliano S., Ye T., Bonet C., Keime C., Kobi D., Le Gras S., Cormont M., Ballotti R., Bertolotto C., & Davidson I. (2011). Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene* **30**: 2319-32.
- Studer L., Csete M., Lee SH., Kabbani N., Walikonis J., Wold B., & McKay R. (2000). Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* **20**: 7377-83.
- Sturm RA. (2002). Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res* **12**: 405-16.
- Takenaka K., Yamagishi S., Jinnouchi Y., Nakamura K., Matsui T., & Imaizumi T. (2005). Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci* **77**: 3231-41.
- Tombran-Tink J., & Johnson LV. (1989). Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**: 1700-7.
- Tombran-Tink J., Chader GG., & Johnson LV. (1991). PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* **53**: 411-4.
- Taniwaki T., Becerra SP., Chader GJ., & Schwartz JP. (1995). Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem* **64**: 2509-17.
- Tombran-Tink J., Mazuruk K., Rodriguez IR., Chung D., Linker T., Englander E., & Chader GJ. (1996). Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* **2**: 11.
- Tombran-Tink J. (2005). The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. *Front Biosci* **10**: 2131-49.
- Tombran-Tink J. (2010). PEDF in angiogenic eye diseases. *Curr Mol Med* **10**: 267-78.
- Tresini M., Pignolo RJ., Allen RG., & Cristofalo VJ. (1999). Effects of donor age on the expression of a marker of replicative senescence (EPC-1) in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* **179**: 11-7.

- Vaupel P., Kallinowski F., & Okunieff P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* **49**: 6449-65.
- Viloria-Petit A., Miquerol L., Yu J.L., Gertsenstein M., Sheehan C., May L., Henkin J., Lobe C., Nagy A., Kerbel R.S., & Rak J. (2003). Contrasting effects of VEGF gene disruption in embryonic stem cell-derived versus oncogene-induced tumors. *EMBO J* **22**: 4091-102.
- Volpert O.V., Zaichuk T., Zhou W., Reiher F., Ferguson T.A., Stuart P.M., Amin M., & Bouck N.P. (2002). Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* **8**: 349-57.
- Vredeveld L.C., Possik P.A., Smit M.A., Meissl K., Michaloglou C., Horlings H.M., Ajouaou A., Kortman P.C., Dankort D., McMahon M., Mooi W.J., & Peeper D.S. (2012). Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev*.
- Wellbrock C., & Marais R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol* **170**: 703-8.
- White E., & Lowe S.W. (2009). Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev* **23**: 784-7.
- Widlund H.R., & Fisher D.E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* **22**: 3035-41.
- Wouters B.G., & Koritzinsky M. (2008). Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 851-64.
- Wu H., Goel V., & Haluska F.G. (2003). PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**: 3113-22.
- Xia X., Lemieux M.E., Li W., Carroll J.S., Brown M., Liu X.S., & Kung A.L. (2009). Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4260-5.
- Xu X., Zhang S.S., Barnstable C.J., & Tombran-Tink J. (2006). Molecular phylogeny of the antiangiogenic and neurotrophic serpin, pigment epithelium derived factor in vertebrates. *BMC Genomics* **7**: 248.
- Yabe T., Herbert J.T., Takanohashi A., & Schwartz J.P. (2004). Treatment of cerebellar granule cell neurons with the neurotrophic factor pigment epithelium-derived factor in vitro enhances expression of other neurotrophic factors as well as cytokines and chemokines. *J Neurosci Res* **77**: 642-52.
- Yamagishi S., Inagaki Y., Nakamura K., Abe R., Shimizu T., Yoshimura A., & Imaizumi T. (2004). Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol* **37**: 497-506.
- Yamamoto A., Tagawa Y., Yoshimori T., Moriyama Y., Masaki R., & Tashiro Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* **23**: 33-42.
- Yang L.P., Cheng P., Peng X.C., Shi H.S., He W.H., Cui F.Y., Luo S.T., Wei Y.Q., & Yang L. (2009). Anti-tumor effect of adenovirus-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor on mouse B16-F10 melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* **28**: 75.
- Yang M.H., & Wu K.J. (2008). TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle* **7**: 2090-6.
- Yasumoto K., Yokoyama K., Shibata K., Tomita Y., & Shibahara S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* **14**: 8058-70.
- Yokoyama S., Woods S.L., Boyle G.M., Aoude L.G., MacGregor S., Zismann V., Gartside M., Cust A.E., Haq R., Harland M., Taylor J.C., Duffy D.L., Holohan K., Dutton-Regester K., Palmer J.M., Bonazzi V., Stark M.S., Symmons J., Law M.H., Schmidt C., Lanagan C., O'Connor L., Holland E.A., Schmid H., Maskiell J.A., Jetann J., Ferguson M., Jenkins M.A., Kefford R.F., Giles G.G., Armstrong B.K., Aitken J.F., Hopper J.L., Whiteman D.C., Pharoah P.D., Easton D.F., Dunning A.M., Newton-Bishop J.A., Montgomery G.W., Martin N.G., Mann G.J., Bishop D.T., Tsao H., Trent J.M., Fisher D.E., Hayward N.K., & Brown K.M. (2011). A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* **480**: 99-103.
- Young A.R., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J.F., Tavaré S., Arakawa S., Shimizu S., & Watt F.M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**: 798-803.

## *Bibliografia*

Zaichuk TA., Shroff EH., Emmanuel R., Filleur S., Nelius T., & Volpert OV. (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* **199**: 1513-22.

Zhu J., Woods D., McMahon M., & Bishop JM. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* **12**: 2997-3007.

Zhuang D., Mannava S., Grachtchouk V., Tang WH., Patil S., Wawrzyniak JA., Berman AE., Giordano TJ., Prochownik EV., Soengas MS., & Nikiforov MA. (2008). C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* **27**: 6623-34.



**ANEXO**



## **PUBLICACIONES**

La mayor parte del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido publicado en el artículo:

Fernández-Barral A, Orgaz JL, Gomez V, del Peso L, Calzada MJ, Jiménez B. (2012). Hypoxia negatively regulates antimetastatic PEDF in melanoma cells by a hypoxia inducible factor-independent, autophagy dependent mechanism. PLoS One 7 (3). doi: 10.1371/journal.pone.0032989.

## **OTRAS PUBLICACIONES**

Orgaz JL., Ladhani O., Hoek KS., Fernandez-Barral A., Mihic D., Aguilera O., Seftor EA., Bernad A., Rodriguez-Peralto JL., Hendrix MJ., Volpert OV., & Jimenez B. (2009). 'Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma'. *Oncogene* 28: 4147-61.

## **CAPÍTULOS DE LIBROS**

Fernández-Barral A, Orgaz JL and Jiménez B. (2011). Pigment epithelium-derived factor – An angiostatic factor with a broader function in melanoma. In: Yohei Tanaka editor. Breakthroughs in melanoma Research. Ed: INTECH. pp. 143-170



# Hypoxia Negatively Regulates Antimetastatic PEDF in Melanoma Cells by a Hypoxia Inducible Factor-Independent, Autophagy Dependent Mechanism

Asunción Fernández-Barral<sup>1,2</sup>, José Luis Orgaz<sup>1,2a</sup>, Valentí Gomez<sup>1,2ab</sup>, Luis del Peso<sup>1,2</sup>, María José Calzada<sup>2,3</sup>, Benilde Jiménez<sup>1,2\*</sup>

**1** Department of Biochemistry, Universidad Autónoma de Madrid (UAM) Madrid, Spain, **2** Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, Spain, **3** Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa and Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

## Abstract

Pigment epithelium-derived factor (PEDF), a member of the serine protease inhibitor (*SERPIN*) superfamily, displays a potent antiangiogenic and antimetastatic activity in a broad range of tumor types. Melanocytes and low aggressive melanoma cells secrete high levels of PEDF, while its expression is lost in highly aggressive melanomas. PEDF efficiently abrogates a number of functional properties critical for the acquisition of metastatic ability by melanoma cells, such as neovascularization, proliferation, migration, invasiveness and extravasation. In this study, we identify hypoxia as a relevant negative regulator of PEDF in melanocytes and low aggressive melanoma cells. PEDF was regulated at the protein level. Importantly, although downregulation of PEDF was induced by inhibition of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, it was independent of the hypoxia inducible factor (HIF), a key mediator of the adaptation to hypoxia. Decreased PEDF protein was not mediated by inhibition of translation through untranslated regions (UTRs) in melanoma cells. Degradation by metalloproteinases, implicated on PEDF degradation in retinal pigment epithelial cells, or by the proteasome, was also excluded as regulatory mechanism in melanoma cells. Instead, we found that degradation by autophagy was critical for PEDF downregulation under hypoxia in human melanoma cells. Our findings show that hypoxic conditions encountered during primary melanoma growth downregulate antiangiogenic and antimetastatic PEDF by a posttranslational mechanism involving degradation by autophagy and could therefore contribute to the acquisition of highly metastatic potential characteristic of aggressive melanoma cells.

**Citation:** Fernández-Barral A, Orgaz JL, Gomez V, del Peso L, Calzada MJ, et al. (2012) Hypoxia Negatively Regulates Antimetastatic PEDF in Melanoma Cells by a Hypoxia Inducible Factor-Independent, Autophagy Dependent Mechanism. PLoS ONE 7(3): e32989. doi:10.1371/journal.pone.0032989

**Editor:** Irina V. Lebedeva, Enzo Life Sciences, Inc., United States of America

**Received:** August 17, 2011; **Accepted:** February 7, 2012; **Published:** March 23, 2012

**Copyright:** © 2012 Fernández-Barral et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants Ministerio de Educación y Ciencia SAF2007-62292 and SAF2010-19256 to BJ, SAF2009-11113 to MJC and SAF2008-03147 to LP. AFB was supported by a CSIC-JAE fellowship, JLO by a Ministerio de Educación y Ciencia SAF2007-62292 contract and VG by S-SAL-0311\_2006 grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: bjimenez@iib.uam.es

<sup>a</sup> Current address: Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College London, London, United Kingdom

<sup>b</sup> Current address: UCL Cancer Institute, University College London, London, United Kingdom

## Introduction

Serine protease inhibitor (*SERPIN*) is a large superfamily of genes that codes for serine protease inhibitors in mammals [1]. However, there is a small number of *SERPIN* family members with non-inhibitory protease activity, among which is included pigment epithelium-derived factor (PEDF, gene symbol *SERPINF1*) [1–5].

PEDF was originally described as the most potent angiostatic factor in the eye [6]. PEDF is produced at high levels by retinal pigment epithelial (RPE) cells, and counteracts a number of potent angiogenic growth factors in the retina; ensuring the right balance of angiogenic regulators that leads to an optimum physiological pattern of blood vessels for a correct retinal function. A number of eye pathologies like diabetic retinopathy and eye-related macular degeneration are associated with loss of PEDF expression, leading to excessive and aberrant vascularization patterns associated with loss of vision [7].

Later studies showed that PEDF is also produced by a wide variety of epithelial cell types and its role in controlling primary tumor growth, angiogenesis and metastatic spread has been explored in a wide range of tumor types [8–10]. Levels of angiostatic PEDF decrease during the progression of a number of cancers, such as hepatocellular carcinoma [11], prostate carcinoma [12,13], breast adenocarcinoma [14], glioblastoma [15] and Wilm's tumors [16].

We have recently shown that melanocytes are also among the cell types in our body that produce and secrete high levels of PEDF [17], which are comparable to the levels produced by RPE cells, neural cells or retinoblastoma cells. We [8,17–19] and others [4,20,21] have described a complex mechanism underlying the potent inhibition of melanoma metastasis by PEDF. PEDF-mediated antitumor activity in melanoma and other tumors is based on its dual action on the tumor microenvironment and on the tumor cells themselves [8]. PEDF inhibits tumor angiogenesis by means of induction of apoptosis on endothelial cells and

modulation of the angiogenic profile of melanoma cells. Additionally, PEDF exerts a potent inhibitory action on melanoma cells, inducing apoptosis under stress conditions (such as absence of growth factors or detachment from the extracellular matrix) and abrogating migration and invasion. More recently we have demonstrated that loss of PEDF expression enables melanoma cells to acquire migratory and invasive properties, as well as vasculogenic mimicry capability, which altogether is translated into an increased *in vivo* metastatic potential [17,19]. Therefore, regulation of PEDF expression could be critical for the malignant progression of human melanoma.

The mechanisms responsible of PEDF reprogramming during the malignant progression of human melanoma are still elusive, and their identification could be of critical importance to better understand the biological significance of PEDF in melanoma. The skin is a mildly hypoxic microenvironment ( $pO_2$  in the dermal/epidermal junctions ranging from 0.5% to 10%) that significantly contributes to melanocyte transformation, as the result of hypoxia promoting both proliferation and survival, and avoiding senescence [22]. Thus, hypoxia has emerged as a relevant tumor-promoting environmental factor in skin melanocytes that cooperates with oncogenic BRAF ( $BRAF^{V600E}$ ) and activation of AKT pathway for malignant transformation [22]. Furthermore, hypoxia has been identified as a critical regulator of invasiveness and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [23] thus promoting metastasis. Additionally, hypoxia is one of the main regulators of angiogenic growth factors and inhibitors, which contributes to tilt the balance toward inducers of angiogenesis and to impose the loss of relevant angiostatic factors during tumor progression [24].

Given the central role of hypoxia in tumor progression and angiogenesis, here we explored whether PEDF expression in human melanocytes and melanoma cell lines is regulated by variations in oxygen tension.

Cells respond to hypoxia through a combination of regulatory mechanisms that results in reduced oxygen consumption and restoration of oxygen supply. A central regulatory mechanism is based on modification of the gene expression profile mastered by the hypoxia-inducible factors (HIFs). HIF is a heterodimer comprising an oxygen-regulated  $\alpha$  subunit ( $HIF\alpha$ ) and a constitutively expressed  $\beta$  subunit ( $HIF\beta$ ).  $HIF\alpha$  family comprises three members:  $HIF1\alpha$ ,  $HIF2\alpha$  and  $HIF3\alpha$  [25–27], which display differential expression and regulate the expression of a subset of non-overlapping target genes. Central to the hypoxia response is a family of 2-oxoglutarate dependent dioxygenases (EGL nine homolog, EGLNs; also called prolyl-hydroxylases, PHDs) that require oxygen as cosubstrate and constitute the main oxygen sensor mechanism so far characterized [28,29]. PHDs hydroxylate  $HIF\alpha$  in two proline residues [30,31] and this posttranslational modification labels  $HIF\alpha$  for proteasomal degradation. Reduced oxygen concentration in hypoxia comprises hydroxylation by PHDs and consequently  $HIF\alpha$  subunits are stabilized. The stabilization of  $HIF\alpha$  allows for the formation of the  $HIF1\alpha/\beta$  heterodimer and lead to HIF-mediated transcription.

Transcriptional reprogramming through HIFs acts in concert with inhibition of translation through inactivation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and activation of the unfolded protein response (UPR); to effectively achieve hypoxia adaptation based on changes in metabolism, angiogenesis, endoplasmic reticulum (ER) homeostasis and autophagy [32,33]. Hypoxia also regulates translation through miRNAs [34,35] and regulation of RNA-binding proteins (RBPs) [36]. Additionally, selective degradation of certain target proteins under hypoxia by diverse degradation routes significantly contributes to hypoxia tolerance mechanisms [37,38].

Here, we study the general characteristics of the mechanism responsible for regulation of PEDF expression by hypoxia in human melanocytes and melanoma cells. Our results show that reduction of PEDF production by hypoxia has common general characteristics with previously described regulation of PEDF in other cell types, and distinct characteristics that specifically involve degradation by autophagy in neural crest derived cells.

## Results

### Hypoxia Downregulates PEDF at the Protein Level in Melanocytes and Melanoma Cell Lines

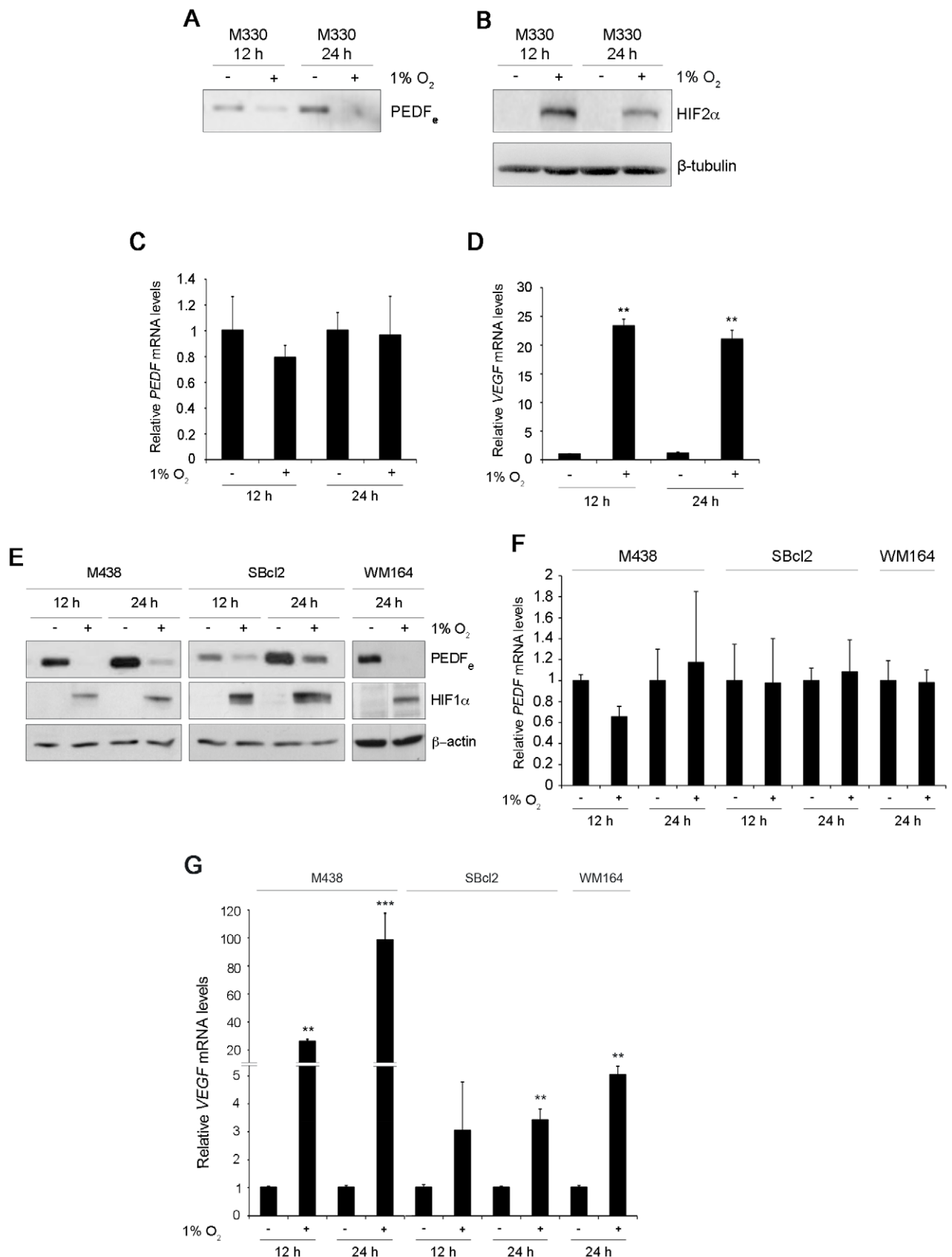
Seeking for regulators of PEDF relevant in the context of melanoma progression we explored whether hypoxia could be a candidate mechanism. In primary cultures of human skin melanocytes we found that extracellular levels of PEDF protein ( $PEDF_e$ ) detected by western blot analysis of conditioned medium gradually decreased under hypoxic (1%  $O_2$ ) (Fig. 1A) and anoxic (0%  $O_2$ ) conditions (Fig. S1). Downregulation of  $PEDF_e$  by hypoxia was detected at 8–12 h and secreted protein levels remained low after 24–48 h of hypoxia (Fig. 1A and data not shown). Establishment of hypoxia response in primary melanocytes was monitored by detection of hypoxia-inducible factor  $2\alpha$  ( $HIF2\alpha$ ) and  $1\alpha$   $HIF1\alpha$  stabilization by western-blot analysis of whole-cell extracts (Fig. 1B and data not shown). We next analyzed mRNA levels of PEDF in normoxic versus hypoxic conditions. Interestingly, we found that PEDF mRNA levels remained constant over the time course in which we detected downregulation of extracellular protein levels (Fig. 1C). VEGF mRNA levels were evaluated under the same experimental conditions as a well characterized HIF transcriptional target. As expected, hypoxia induced a large increase in VEGF mRNA levels in melanocytes (Fig. 1D). These results demonstrate that hypoxia downregulates secreted levels of PEDF at the protein level in melanocytes by posttranscriptional mechanisms.

Downregulation of extracellular PEDF by hypoxia was detected in serum-free conditioned medium and growth factor supplemented conditioned medium (Fig. S2A). Although PEDF is very efficiently secreted and consequently we detected low intracellular PEDF ( $PEDF_i$ ) levels in melanoma cell lines, additionally, we checked whether intracellular PEDF levels were modulated by hypoxia. Our results indicated that  $PEDF_i$  was downregulated by hypoxia and this downregulation was also independent of the presence or absence of growth factors (Fig. S2B). Rate of DNA synthesis was not affected by hypoxic conditions used in NHEM primary melanocytes and SBcl2 melanoma cell line (Fig. S3).

We also examined whether hypoxia downregulated PEDF in poorly aggressive melanoma cell lines that produce endogenous PEDF levels similar to primary melanocytes [17]. Hypoxia downregulated  $PEDF_e$  in SBcl2 and WM164 melanoma cell lines with a similar kinetics and extent to those found in primary melanocytes (the melanocyte primary culture M438 was used as a reference) (Fig. 1E). Also, in agreement with our results in primary melanocytes, PEDF mRNA levels were not modulated by hypoxia in the melanoma cell lines tested (Fig. 1F). Regulation of VEGF mRNA levels by hypoxia was used as positive control (Fig. 1G). VEGF mRNA induction by hypoxia was confirmed in primary melanocytes, SBcl2 and WM164 melanoma cell lines.

### Hypoxia Inducible Factor Does Not Mediate Downregulation of PEDF by Hypoxia in Melanocytes and Melanoma Cell Lines

PHDs are the best characterized cellular oxygen sensors and they trigger many of the responses to hypoxia. Thus, we next



**Figure 1. Hypoxia downregulates PEDF at the protein level in melanocytes and human melanoma cell lines.** Western blot analysis of (A) extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM) and (B) HIF2 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts (B) from M330 primary melanocytes incubated under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 12 h or 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. Quantitative RT-PCR

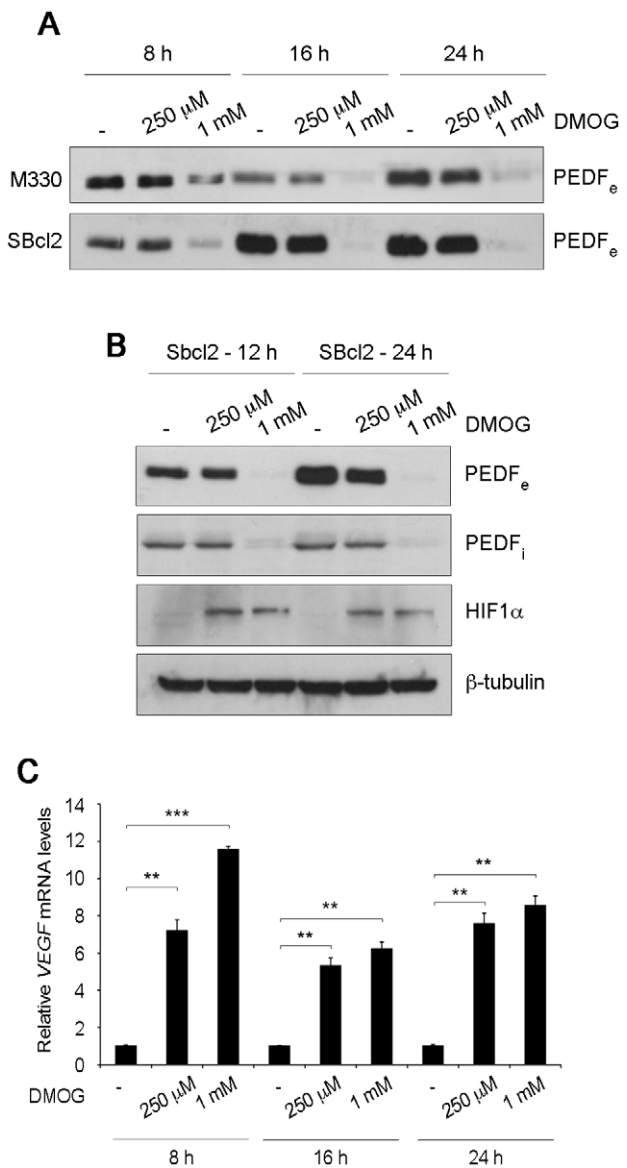
analysis of (C) *PEDF* mRNA levels and (D) *VEGF* mRNA levels in M330 primary melanocytes incubated in normoxia or hypoxia for 12 h or 24 h. *PEDF* and *VEGF* mRNA levels are shown relative to cells in normoxia after normalization to  $\beta$ -actin. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD) (\*\* $P < 0.01$ ). (E) Western blot analysis of  $\text{PEDF}_e$  protein levels in CM and HIF1 $\alpha$  in whole-cell extracts from M438 primary melanocytes, SBcl2 and WM164 melanoma cell lines incubated in normoxia or hypoxia for 12 h or 24 h.  $\beta$ -actin was used as loading control. Quantitative RT-PCR analysis of (F) *PEDF* mRNA levels and (G) *VEGF* mRNA levels in M438 primary melanocytes, SBcl2 and WM164 melanoma cell lines incubated under normoxia or hypoxia for 12 h or 24 h. *PEDF* and *VEGF* mRNA levels are shown relative to normoxia after normalization to  $\beta$ -actin. Bars represent average  $\pm$  SD (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).  
doi:10.1371/journal.pone.0032989.g001

decided to assess the effect of PHD inhibition on PEDF regulation. As PHDs require oxygen, iron ascorbate and 2-oxoglutarate as cosubstrates, we used the synthetic 2-oxoglutarate antagonist DMOG (N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine methyl ester) to inhibit their activity. Treatment of primary melanocytes (M330) and SBcl2 melanoma cells with 1 mM DMOG led to a significant and time-dependent decrease in secreted PEDF levels detected by western blot of conditioned medium (Fig. 2A). When we analyzed the effect of DMOG in  $\text{PEDF}_i$  protein levels, we also found a similar dose response and kinetics as for the downregulation of extracellular PEDF by DMOG (Fig. 2B). As expected, we observed HIF1 $\alpha$  stabilization after DMOG treatment (Fig. 2B), although a lower dose was required. The effects of DMOG were further confirmed analyzing the dose response and kinetics of *VEGF* mRNA levels (Fig. 2C). These results showed a significant difference between the DMOG dose required for maximum downregulation of PEDF protein levels and HIF stabilization; pointing that decreased PEDF protein was PHD-dependent but HIF-independent.

To further explore whether HIF was involved in the decrease in PEDF protein levels imposed by hypoxia in primary melanocytes (M13) and SBcl2 melanoma cells, we silenced HIF1 $\alpha$  expression using shRNA<sup>mir</sup> to HIF1 $\alpha$  (shHIF1 $\alpha$  delivered by lentiviral transduction (Fig. 3). Non-silencing (NS) shRNA<sup>mir</sup> (shNS) was used as control. Lentiviral transduction of primary melanocytes (M13) and SBcl2 cells was highly efficient as demonstrated by the high percentage of GFP positive cells (Fig. 3A). Efficiency of HIF1 $\alpha$  silencing was determined analyzing HIF1 $\alpha$  mRNA levels by quantitative RT-PCR, being this higher than 80% in primary melanocytes and SBcl2 melanoma cells (Fig. 3B). Despite the efficient silencing of HIF1 $\alpha$  in primary melanocytes, hypoxic conditions reduced secreted and intracellular PEDF to a similar extent in shNS and shHIF1 $\alpha$  cells (Fig. 3C). To further confirm HIF1 $\alpha$  silencing in melanocytes we checked mRNA levels of the known HIF direct genes *VEGF* and *BNIP3*. Induction by hypoxia of both HIF genes in melanocytes was efficiently abrogated by shHIF1 $\alpha$  (Fig. 3D). In agreement with our results in melanocytes, HIF1 $\alpha$  silencing in SBcl2 melanoma cells did not interfere with downregulation of secreted PEDF protein levels by hypoxia (Fig. 3E). Interestingly, knock-down of HIF1 $\alpha$  in SBcl2 melanoma cells diminished *VEGF* and *BNIP3* mRNA induction by hypoxia, although to a lesser extent than observed in melanocytes (Fig. 3F). These results could be explained by differences in the mechanisms that mediate regulation of expression of HIF target genes in primary melanocytes versus melanoma cells.

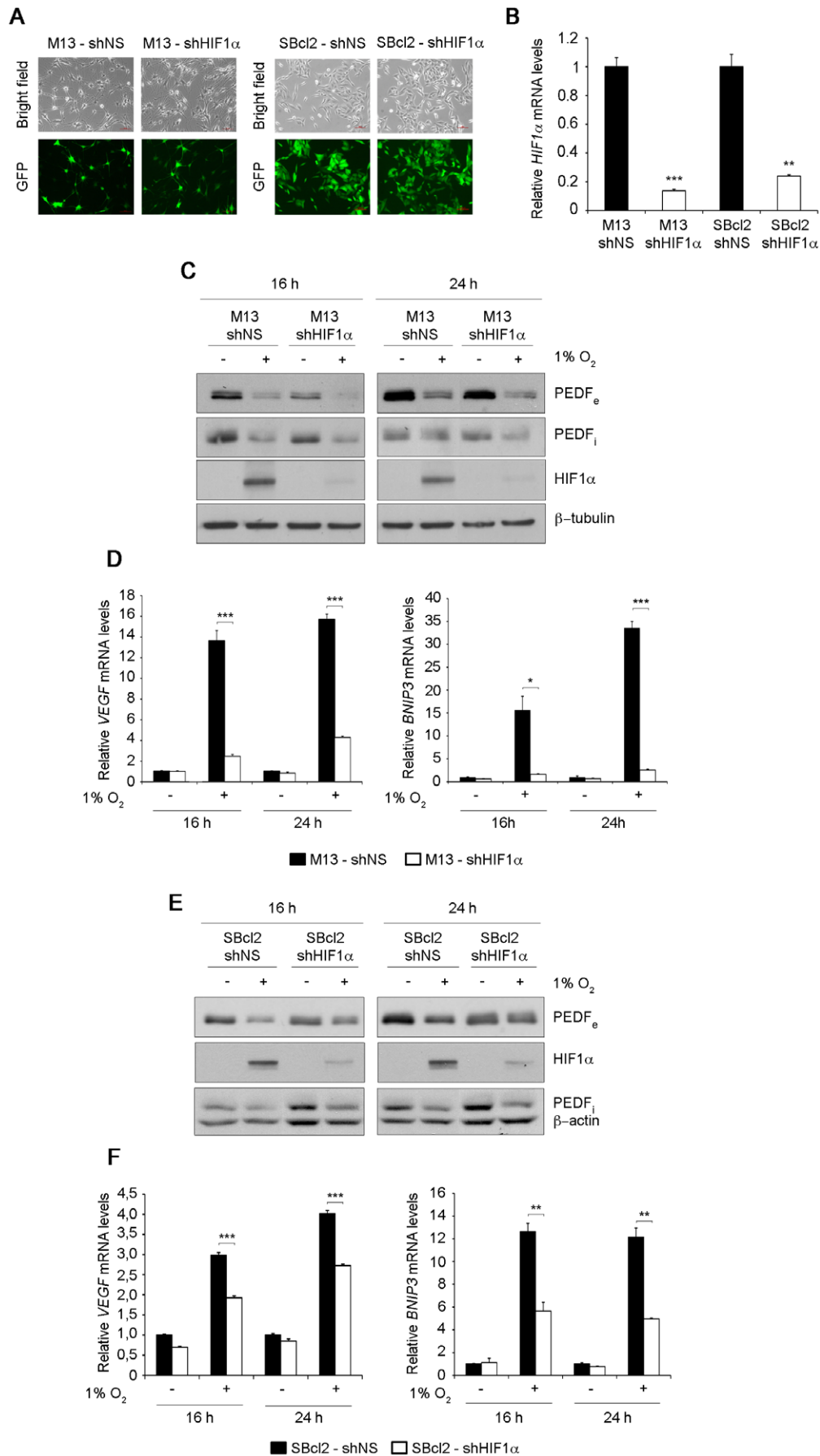
### UTRs Are Not Required for PEDF Downregulation by Hypoxia in Melanoma Cell Lines

To further confirm that PEDF is regulated by hypoxia at the protein level in melanoma cells, we analyzed the effect of hypoxia on exogenous PEDF expressed from a heterologous promoter (CMV promoter in pCEP4-PEDF vector). SBcl2 melanoma cells were stably transfected with pCEP4 (SBcl2-pCEP4) or pCEP4-PEDF (SBcl2-pCEP4-PEDF). Downregulation of endogenous secreted PEDF by hypoxia and DMOG was confirmed in control



**Figure 2. Inhibition of PHDs leads to decreased PEDF protein in normoxia in melanocytes and SBcl2 melanoma.** (A) Western blot analysis of extracellular PEDF ( $\text{PEDF}_e$ ) protein levels in conditioned medium (CM) from M330 primary melanocytes (upper blot) and SBcl2 melanoma cell line (lower blot) treated with different concentrations of DMOG for 8 h, 16 h or 24 h. (B) Western blot analysis of  $\text{PEDF}_e$  protein levels in CM, intracellular PEDF ( $\text{PEDF}_i$ ) and HIF1 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts from SBcl2 melanoma cells treated with DMOG for 12 h and 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. (C) Quantitative RT-PCR analysis of *VEGF* mRNA levels in SBcl2 melanoma cell line treated with DMOG for the indicated times. *VEGF* levels are shown relative to controls without DMOG in time points, after normalization to 18s rRNA. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD) (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).  
doi:10.1371/journal.pone.0032989.g002





**Figure 3. Hypoxia-induced downregulation of PEDF is HIF-independent in melanocytes and SBcl2 melanoma.** (A) Transduction efficiency of M13 primary melanocytes (left panels) and SBcl2 melanoma cell line (right panels) after infection with non-silencing (shNS) or shRNA<sup>mir</sup> to HIF1 $\alpha$  (shHIF1 $\alpha$ ) lentivirus at multiplicity of infection of 40 (M13) or 60 (SBcl2). Fluorescence images (40 $\times$  magnification) show more than 90% GFP-positive cells. (B) Quantitative RT-PCR analysis of *HIF1 $\alpha$*  mRNA levels in M13-shNS, M13-shHIF1 $\alpha$  primary melanocytes and SBcl2-shHIF1 $\alpha$  melanoma cell lines. *HIF1 $\alpha$*  mRNA levels are shown relative to control shNS cells after normalization to 18s rRNA. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD) (\*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001). (C) Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM), intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>) and HIF1 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts from M13-shNS and M13-shHIF1 $\alpha$  primary melanocytes incubated under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 16 h and 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. (D) Quantitative RT-PCR analysis of *VEGF* (left panel) and *BNIP3* (right panel) mRNA levels in M13-shNS (filled bars) and M13-shHIF1 $\alpha$  (empty bars) primary melanocytes. *VEGF* and *BNIP3* mRNA levels are shown relative to M13-shNS under normoxia after normalization to 18s rRNA. Bars represent average  $\pm$  SD (\* $P$ <0.05; \*\*\* $P$ <0.001). (E) Western blot analysis of PEDF<sub>e</sub> protein levels in CM, PEDF<sub>i</sub> and HIF1 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts from SBcl2-shNS and SBcl2-shHIF1 $\alpha$  melanoma cell lines incubated under normoxia or hypoxia for 16 h and 24 h.  $\beta$ -actin was used as loading control. (F) Quantitative RT-PCR analysis of *VEGF* (left panel) and *BNIP3* (right panel) mRNA levels in SBcl2-shNS (filled bars) and SBcl2-shHIF1 $\alpha$  (empty bars) melanoma cell lines. *VEGF* and *BNIP3* mRNA levels are shown relative to SBcl2-shNS under normoxia after normalization to 18s rRNA. Bars represent average  $\pm$  SD (\*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001). doi:10.1371/journal.pone.0032989.g003

SBcl2-pCEP4 cells (Fig. 4A). Regulation of exogenous PEDF protein was monitored by means of a histidine tag (5-HIS) fused to PEDF in pCEP4-PEDF vector. Figure 4A shows that hypoxia and DMOG efficiently reduced exogenous secreted PEDF protein levels in SBcl2-pCEP4-PEDF cells. Additionally, we confirmed that intracellular PEDF protein levels decreased in SBcl2-pCEP4 and SBcl2-pCEP4-PEDF cells under hypoxia or DMOG treatment (Fig. 4B). Stabilization of HIF1 $\alpha$  protein as a control of hypoxia response is shown in all the experimental conditions used (Fig. 4B). Given that exogenous PEDF expressed from pCEP4-PEDF vector lacked the 5' and 3' untranslated regions (UTRs), downregulation of PEDF by hypoxia was most likely not mediated through UTR inhibition of translation. In order to directly assess the role of SERPINF1 UTRs in the regulation of PEDF by hypoxia in melanoma cells we cloned the 3'UTR of PEDF in a Renilla reporter construct psiCHECK2 (psiCHECK2-3'PEDF) and analyzed the 3'UTR of PEDF using UTR reporter assays in normoxic versus hypoxic conditions in melanoma cells. We used the 3'UTR of GAPDH (psiCHECK2-3'GAPDH) as a control, together with the empty psiCHECK2 plasmid, since it was previously shown that hypoxia did not modify the translation of GAPDH mRNA [39]. We first confirmed that hypoxia downregulated extracellular and intracellular PEDF protein levels (Fig. 4C) in SBcl2 cells. As in previous experiments hypoxia response in SBcl2 cells was confirmed by stabilization of HIF1 $\alpha$  detected by western blot analysis of whole-cell extracts (Fig. 4C). Afterward, in transient transfection experiments, we found no significant differences in reporter activity when we compared psiCHECK2-3'UTR PEDF with empty vector or psiCHECK2-3'UTR GAPDH (Fig. 4D), indicating that the 3'UTR of PEDF does not mediate inhibition of translation under hypoxic conditions. These results were also confirmed in M000921 human melanoma cell line in which PEDF (intracellular and extracellular) is highly regulated by hypoxia and presents a higher efficiency of transfection (Fig. S4).

In summary, these results support that PEDF downregulation is not mediated by regulation of translation through UTRs.

### Degradation by Metalloproteinases or the Proteasome Does Not Mediate Downregulation of PEDF by Hypoxia in Melanoma Cell Lines

As no difference in PEDF mRNA level was detected in hypoxia compared to normoxia in melanocytes or melanoma cells, and inhibition of translation through UTRs was not involved in the downregulation of PEDF, it stands to reason that hypoxic regulation of PEDF could likely occur at the posttranslational level.

Matrix metalloproteinases type 2 (MMP-2) and type 9 (MMP-9) belong to the large MMP family of Zn<sup>2+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-dependent

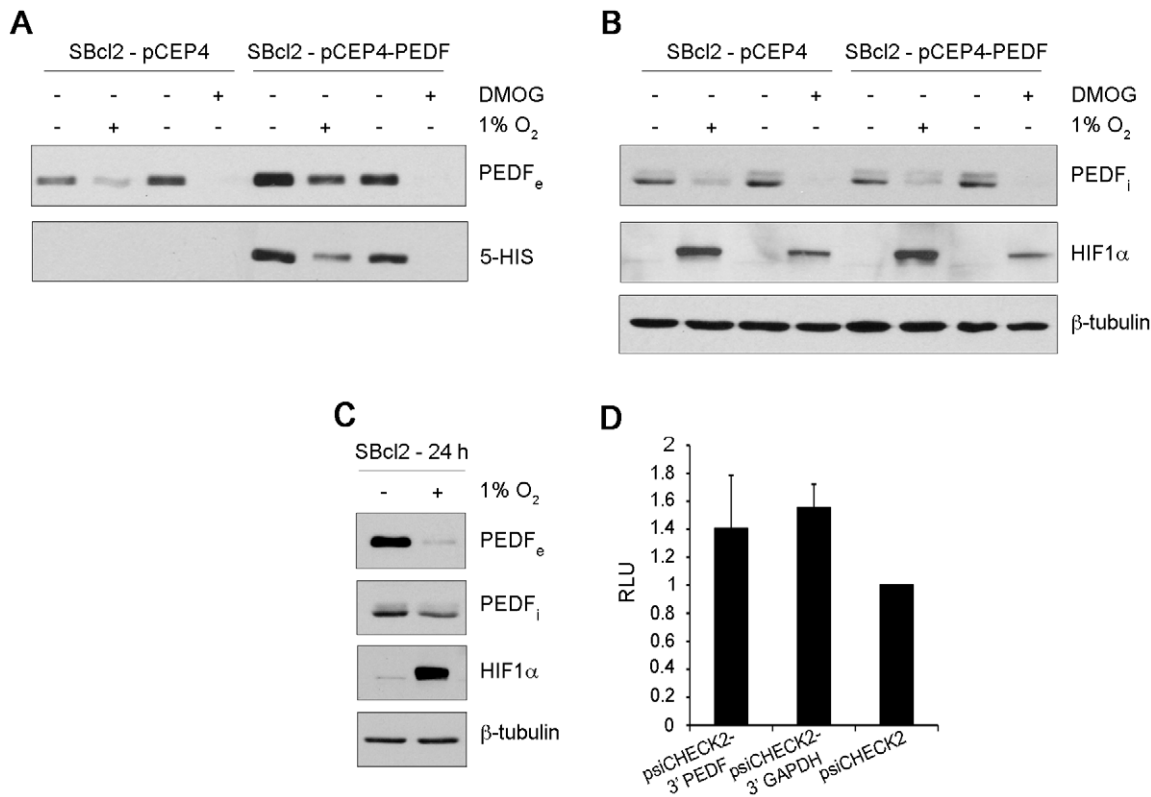
extracellular proteinases that are critically involved in the regulation of migration, invasion and angiogenesis [40,41]. It has been shown that PEDF produced by RPE cells is degraded extracellularly by MMP-2 and MMP-9 activated in hypoxic conditions [37]. Therefore, we studied whether this posttranslational regulatory mechanism could be responsible of decreased the PEDF protein in neural crest-derived pigment cells (melanocytes and melanoma cells) under hypoxia. Conditioned medium from control or DMOG-treated melanocytes and SBcl2 cells were tested for protein degradation activity against exogenously added purified recombinant human PEDF (rhuPEDF). *In vitro* incubation of rhuPEDF with either direct or concentrated conditioned medium from DMOG-treated melanocytes and SBcl2 cells did not produce any significant degradation of the exogenous PEDF protein (Fig. 5A). Incubation with EDTA was used to inhibit expected induction of metalloproteinase activity by hypoxia. Downregulation of endogenous secreted PEDF protein by hypoxia was confirmed in concentrated conditioned medium from control versus DMOG-treated melanocytes and SBcl2 cells (Fig. 5A). Furthermore and in agreement with previous results, cells treated with the metalloproteinase inhibitor GM6001 did not block downregulation of secreted PEDF protein levels by hypoxia in SBcl2 melanoma cells (Fig. 5B).

We next studied whether decreased PEDF protein levels under hypoxia were a consequence of degradation by the proteasome, and found that the diminished PEDF<sub>e</sub> protein levels in hypoxia were not recovered when we treated SBcl2 and WM164 cells with the proteasome inhibitor MG132 (Fig. 5C). As expected, MG132 stabilized HIF1 $\alpha$  in normoxic conditions (Fig. 5C).

Hence, these results indicated that neither extracellular degradation by metalloproteinases nor proteasomal degradation was implicated in the downregulation of PEDF protein levels by hypoxia in melanocytes and melanoma cells.

### Downregulation of PEDF by Hypoxia in Melanoma Cell Lines Involves Degradation by Autophagy

Autophagy is a tightly controlled degradation pathway that has been recently shown to be activated in response to hypoxia [42–44]. Among the identified autophagy-related proteins, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) has been widely used to monitor the autophagic response [45,46]. LC3 exists in two forms: LC3-I (18 kDa) localized in the cytosol and its proteolytic derivative LC3-II (16 kDa) which is modified by conjugation with phosphatidylethanolamine and bound to autophagosomal membranes. Additionally, decreased levels of sequestosome 1 (SQSTM1/p62) were used to monitor induction of autophagy by hypoxia [44]. Hypoxia induced accumulation of LC3-II positive autophagic vacuoles in SBcl2 cells with a rapid and sustained kinetics (Fig. S5). Induction of autophagy by hypoxia was



**Figure 4. UTRs are not required for PEDF downregulation by hypoxia in SBcl2 melanoma.** Western blot analysis from SBcl2-pCEP4 and SBcl2-pCEP4-PEDF melanoma cell lines incubated with 1 mM DMOG or under hypoxia (1% O<sub>2</sub>): (A) extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) and Penta-HIS (5-HIS) protein levels in 24 h conditioned medium (CM) and (B) intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>) and HIF1α protein levels in whole-cells extract. β-tubulin was used as loading control. (C) Western blot analysis of PEDF<sub>e</sub> protein levels in 24 h CM, PEDF<sub>i</sub> and HIF1α protein levels in whole-cell extracts from SBcl2 melanoma cell line incubated under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>). β-tubulin was used as loading control. (D) UTR-reporter assay in SBcl2 melanoma cell line transfected with a Renilla promoter reporter containing the 3' UTR of PEDF (psiCHECK2-3' PEDF), the 3' UTR of GAPDH (psiCHECK2-3' GAPDH) or an empty reporter (psiCHECK2) and incubated under normoxia or hypoxia for 24 h. Renilla activity was normalized to luciferase activity, which is used as an internal control of transfection efficiency. psiCHECK2-3' GAPDH was used as a negative control. Bars represent average ± standard deviation (SD).

doi:10.1371/journal.pone.0032989.g004

further demonstrated by decreased the levels of LC3-II and p62 in SBcl2 and M000921 melanoma cells (Fig. 6A). Quantification of SBcl2 cells with autophagic vacuoles showed a significant increase ( $***P<0.001$ ) in hypoxia versus normoxia (Fig. 6C). As an additional control we show that ischemic conditions mimicked by glucose starvation induced a similar pattern of accumulation and distribution of GFP-LC3 signal than hypoxia in SBcl2 cells (Fig. 6D).

To investigate whether autophagy was implicated on the degradation of PEDF by hypoxia in SBcl2 melanoma cells we used bafilomycin A1 (Baf. A1), which inhibits the vacuolar ATPase and blocks the fusion of autophagosomes with lysosomes [47]. As expected, Baf. A1 treatment of SBcl2 and M000921 cells induced accumulation of LC3-II and p62 detected by western-blot (Fig. 6A) and redistribution of GFP-LC3 fusion construct into punctuate cytoplasmic structures indicative of accumulation of autophagic vacuoles (Fig. 6B, C). Figure 6A shows that Baf. A1 treatment efficiently blocked downregulation of PEDF<sub>e</sub> and PEDF<sub>i</sub> (Fig. 6A) by hypoxia.

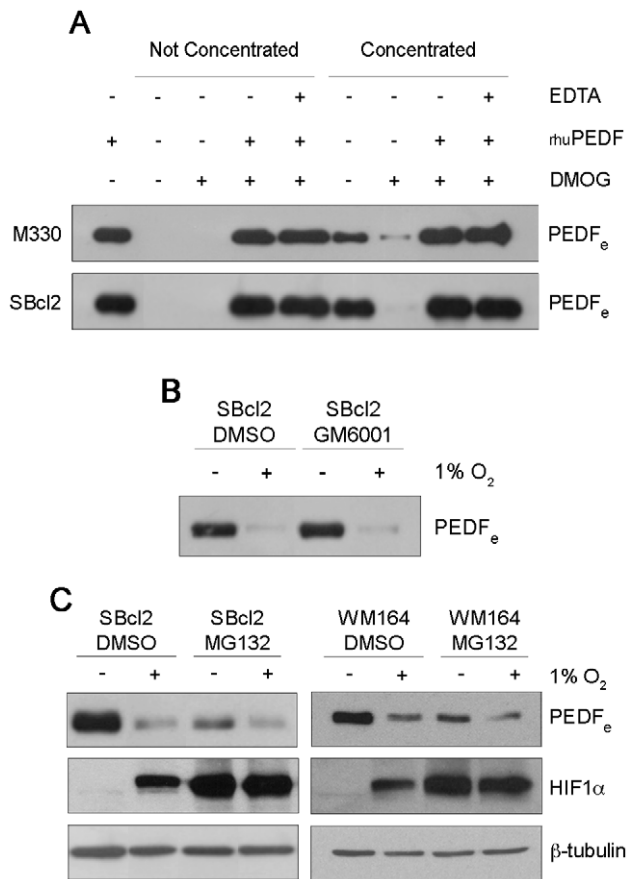
Implication of autophagy in the degradation of PEDF under hypoxia was further confirmed by silencing of LC3 in SBcl2 melanoma cells. LC3 was efficiently interfered in SBcl2 melanoma cells using shRNA<sup>mir</sup> to LC3 (Fig. 7A–B). Silencing of LC3 prevented PEDF downregulation by hypoxia (Fig. 7C).

These results implied that autophagy-mediated degradation of PEDF is induced in response to hypoxia in melanoma cells.

## Discussion

PEDF was first identified as an endogenous inhibitor of angiogenesis in the eye [48]. RPE cells secrete high levels of PEDF to ensure a proper balance of neovascularization in the retina. Avascular eye compartments like the cornea and the vitreous are rich in PEDF. Therefore, PEDF plays a pivotal role on maintaining the eye vasculature in a quiescent state and loss of its expression is associated with pathological neovascularization leading to compromised vision and blindness [6].

We have recently shown that PEDF is also produced at high levels by neural crest-derived pigment-producing cells, the skin melanocytes [17]. The role of PEDF in the control of physiological skin vascularization remains to be characterized. Given PEDF's role as an antiangiogenic factor, we have recently described the regulation of its expression during the malignant progression of human melanomas and the functional consequences of loss of PEDF expression [17]. PEDF expression is high in melanocytes, but it is lost during malignization of human melanoma. *In vitro* and *in vivo* functional analysis combined with interference strategies to silence PEDF, led us to demonstrate that PEDF has a broad



**Figure 5. Hypoxia-induced downregulation of PEDF in melanocytes and SBcl2 melanoma cells is not mediated by metalloproteinases or proteasomal degradation.** (A) Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in 24 h conditioned medium (CM) from M330 primary melanocytes (upper blot) and SBcl2 melanoma cell line (lower blot). Cells were treated with 1 mM DMOG for 24 h and the CM were incubated with 100 ng human recombinant PEDF (rhPEDF) and 20 mM EDTA at 37°C for 2 h. (B) Western blot analysis of PEDF<sub>e</sub> protein levels in CM from SBcl2 melanoma cell line treated with metalloproteinase inhibitor GM6001 (10 μM) and incubated under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h. (C) Western blot analysis of PEDF<sub>e</sub> protein levels in 16 h CM and HIF1α protein levels in whole-cell extracts from SBcl2 and WM164 melanoma cell lines after treatment with the proteasome inhibitor MG132 (5 μM and 1 μM respectively) under normoxia or hypoxia. β-tubulin was used as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0032989.g005

function in melanoma that allows it to dually impinge on the vascular component of the tumor microenvironment and on directly counteracting a set of capabilities that enable the metastatic spread of melanoma cells [17,19].

The functional relevance and multifunctionality of PEDF in melanoma prompted us to identify an important regulatory mechanism during melanoma progression. Our results suggest that PEDF expression could be modulated by two general types of mechanisms, reprogramming events and loss of expression [17].

Hypoxia is a hallmark of tumors that results from an imbalance between oxygen supply and consumption in continuously proliferating cancer cells in a tumor mass devoid of an adequate vascular network to cope with imposed oxygen demand. Consequently, hypoxia is one of the main triggers of tumor neovascularization and has been shown to contribute to tumor cell invasion, migration and metastasis [49].

Signals from the microenvironment such as hypoxia and inflammation are thought to reprogram and switch melanoma cells toward an invasive phenotype [50], and therefore, could be responsible for the reprogramming of PEDF during melanoma progression.

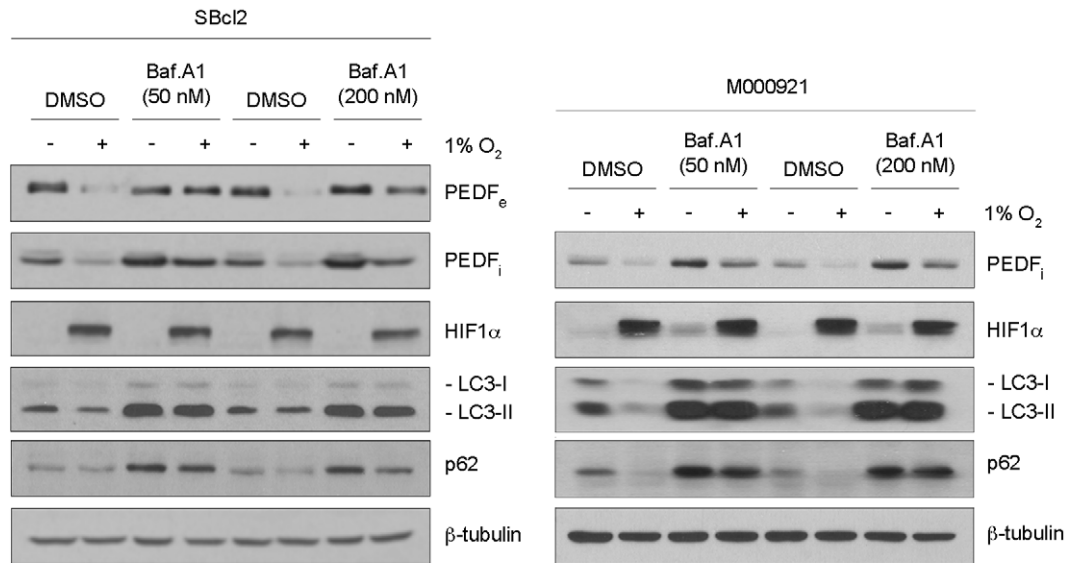
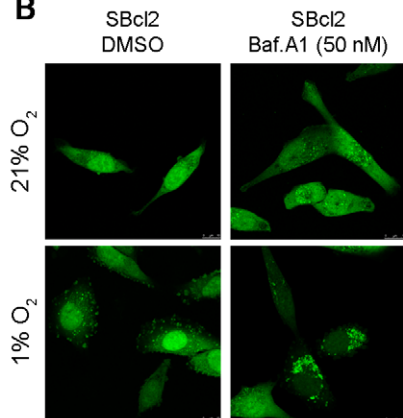
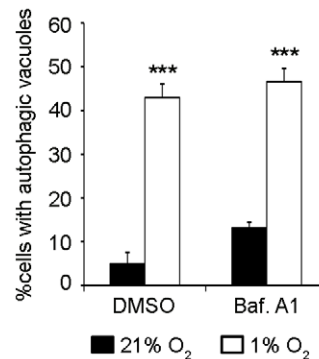
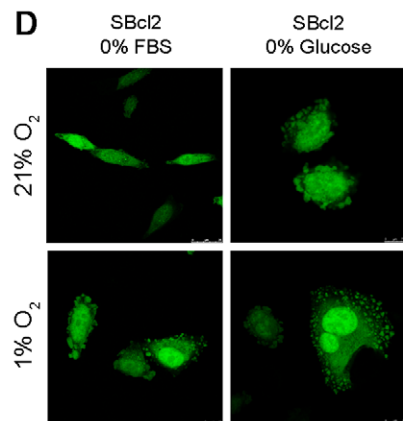
Previous reports described that PEDF is decreased by hypoxia in retinoblastoma [48] and RPE cells [37], although none of them studied the role of HIF in PEDF downregulation. Here, we describe the general characteristics of the mechanism responsible of decreased PEDF protein levels under hypoxia in human melanocytes and melanoma cells. We show that secreted PEDF, as well as intracellular PEDF protein levels, decrease under low oxygen conditions in primary melanocytes and several human melanoma cell lines. However, we found no significant differences in PEDF mRNA levels when we compared hypoxic versus normoxic conditions, suggesting that regulation of PEDF by hypoxia was posttranscriptional. This result is in agreement with previous studies in retinoblastoma cells and RPE cells in which diminished PEDF protein levels under hypoxia did not correlate with changes in PEDF mRNA levels [37,48].

Moreover, in support to our results, the meta-analysis of gene profiling data sets from 16 independent experiments by Ortiz-Barahona and collaborators [51] confirmed there was no variation in PEDF mRNA levels in normoxic versus hypoxic conditions (data not shown).

HIF plays a central role in the regulation of the cell responses that allows adaptation to reduced oxygen tension. Although PEDF was not regulated at the transcriptional level, molecules downstream HIF could be involved in PEDF downregulation. We therefore analyzed whether HIF was implicated in the observed effects on PEDF in primary melanocytes and melanoma cell lines. Using lentiviral transduction of shRNA specific to HIF1α, we demonstrated that decreased PEDF protein levels in melanocytes and melanoma cells were not mediated by HIF1α.

Alternative mechanisms that participate in the downregulation of specific targets under hypoxia are the following: (i) regulation of translation by miRNAs and RBPs [52], (ii) selective degradation of hypoxia targets by the proteasome [38] or metalloproteinases [37] (iii) inhibition of translation through mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase, (iv) activation of the unfolded protein response [33,53] and (v) degradation by autophagy [42–44].

Inhibition of overall protein synthesis has long been accepted as a general trait of adaptation to hypoxia [54]. Notwithstanding, translation of specific mRNAs is favored by low oxygen tension. This is the case of the mRNAs of *HIF1α* [39] and *VEGFA* [55] which harbor regulatory elements that promote their preferential translation under overall translation inhibition imposed by hypoxia. We have directly addressed whether downregulation of PEDF by hypoxia occurs at the translational or posttranslational level. Two independent approaches allowed us to conclude that translation of PEDF mRNA is unlikely to be regulated by low oxygen tension. First, exogenous PEDF produced using vector constructs lacking the 5'UTR and 3'UTR was effectively decreased under hypoxic conditions. Furthermore a reporter construct of PEDF 3'UTR was not affected by hypoxic conditions in several melanoma cell lines. However, the UTRs are highly conserved in *SERPINF1* among different species, which points to their putative regulatory role by an as yet unidentified mechanism. Secondly, we used a bioinformatic approach to predict putative targets sequences for the RBPs HuR and TIA-1 [56,57]. This program identifies motifs that share two common characteristics: (i) a primary sequence over 20 bp rich in AU and (ii) a specific secondary structure named stem-loop. With this approach we identified a small region rich in AU in the 3' UTR of *SERPINF1*

**A****B****C****D**

**Figure 6. Autophagy is involved in downregulation of PEDF by hypoxia in melanoma cells.** (A) Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in 24 h conditioned medium (CM), intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>), HIF1α, LC3 and p62 protein levels in whole-cell extracts from SBcl2 (left) and M000921 (right) melanoma cell lines treated with different concentrations of the autophagy inhibitor bafilomycin A1 (Baf. A1, 50 nM and 200 nM) or DMSO vehicle under normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions. β-tubulin was used as loading control. (B) Fluorescence images (63× magnification) of GFP-LC3 protein redistribution in SBcl2 melanoma cell line (transduced with pLV-EGFP-LC3 plasmid) treated with 50 nM Baf. A1 in normoxia or hypoxia for 24 h. (C) Quantification of SBcl2 cells with autophagic vacuoles after Baf. A1 treatment for 24 h under normoxia (filled bars) and hypoxia (open bars) conditions. (D) Fluorescence images (63× magnification) of GFP-LC3 protein redistribution in SBcl2 melanoma cell line (transduced with pLV-EGFP-LC3 plasmid) treated with 50 nM Baf. A1 in normoxia or hypoxia for 24 h.

bars) or hypoxia (empty bars). Ten fields from each condition were counted for quantification. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD) ( $***P<0.001$ ). (D) Fluorescence images ( $63\times$  magnification) of GFP-LC3 redistribution in SBcl2 melanoma cell line grown in the absence of growth factors (0% FBS) or ischemic conditions (0% glucose) under normoxia or hypoxia. doi:10.1371/journal.pone.0032989.g006

(data not shown). However, this sequence was in a non-conserved region and it was not identified by the *in silico* analysis as a putative RBP binding site; most likely due to lack of the secondary structure necessary for the binding of HuR or TIA-1.

These results prompted us to directly address the implication of degradation pathways relevant in the context of hypoxia response as the main mechanism underlying decreased PEDF protein levels under low oxygen tension conditions in melanocytes and melanoma cells.

The first candidate that we explored was the proteasome. The proteasome has been recently implicated on the selective degradation of specific targets under low oxygen conditions. This mechanism is responsible of downregulating the ternary complex

factor net under hypoxia [38]. However, inhibition of the proteasome using MG132 did not block downregulation of PEDF levels by hypoxic conditions in melanoma cell lines. Also, the fact that decreased PEDF protein levels under low oxygen tension were not mediated by the proteasome makes it unlikely that activation of the UPR could be involved.

Taking into account a previously reported implication of metalloproteinases in the downregulation of PEDF protein levels under hypoxia in RPE cells [37] we checked whether this mechanism could be also operating in neural crest-derived pigment-producing cells. Our results demonstrate that induction of metalloproteinases by hypoxia was not responsible of decreased PEDF protein levels in melanoma cell lines.

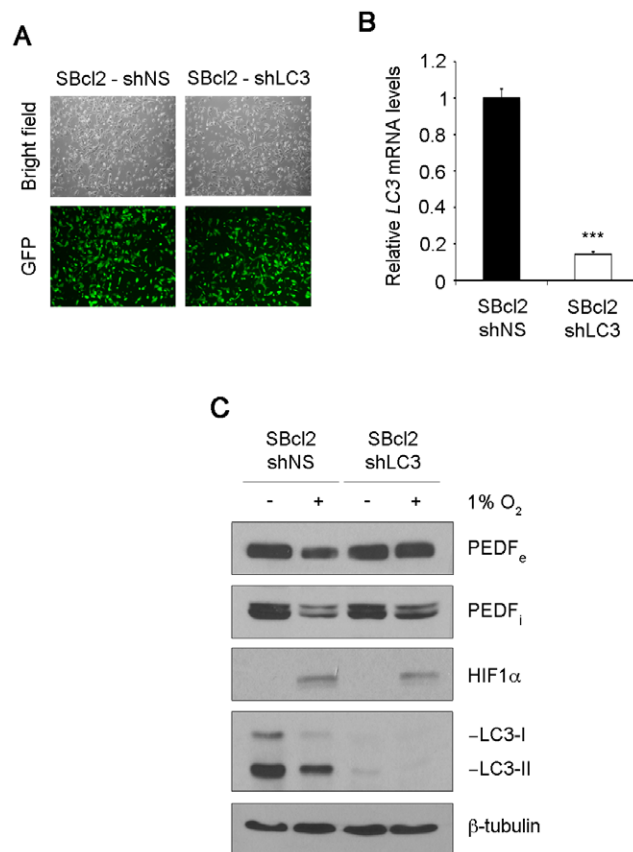
An alternative degradation pathway that has been recently demonstrated to be relevant to the hypoxia adaptation response is degradation by autophagy [33,42–44]. Specific targets downregulated by hypoxia have been shown to be degraded by autophagy. We show that hypoxic conditions significantly induced autophagy in melanoma cells as revealed by the punctuated phenotype of GFP-LC3 labeling and downregulation of LC3-II and p62 levels. The autophagy inhibitor Bafilomycin A1 (Baf. A1), which blocks the fusion of autophagosomes with lysosomes, abrogated downregulation of PEDF protein levels under low oxygen tension in melanoma cells. Silencing of LC3 also prevented PEDF downregulation by hypoxia in melanoma cells. These results support that decreased extracellular PEDF levels by hypoxia are a consequence of degradation by autophagy of intracellular PEDF, resulting in loss of its biological activities in pigment-producing melanocytes and melanoma cells.

Altogether our results point to hypoxia as a permissive environment associated with decreased production of PEDF by melanocytes and melanoma cells that in turn impacts on the acquisition of a more malignant phenotype. Furthermore, downregulation of PEDF at low oxygen tension is HIF-independent and occurs at the level of protein degradation involving the participation of autophagy as the most likely candidate mechanism. Both hypoxia and autophagy play a significant role in the context of melanoma progression [22,58–60], therefore we have identified a relevant mechanism that may underlie reprogramming of PEDF expression during the malignant progression of melanoma. Loss of PEDF expression during melanoma malignization enables acquisition of angiogenic, invasive and metastatic capabilities to melanoma cells [17,19]. Hypoxic conditions at the invasive front could be responsible of required decreased PEDF levels to enable low proliferation and increased migration and invasiveness characteristic of invasive phenotype melanoma cells. Both heterogeneity in tumor oxygenation, as well as colonization of new tissue environments characterized by higher oxygen tensions than the skin may lead to PEDF regulation in melanoma lesions [17] and subsequent reprogramming back to high PEDF to allow melanoma cells to gain the proliferative potential required to successfully colonize target organs.

## Materials and Methods

### Ethics statement

The present study was approved by the institutional Review Board of Children's Hospital Universitario Niño Jesús (Madrid,



**Figure 7. LC3 knock-down prevents downregulation of PEDF by hypoxia in melanoma cells.** (A) Transduction efficiency of SBcl2 melanoma cell line after infection with non-silencing (shNS) or shRNA<sup>mir</sup> to LC3 (shLC3) lentivirus at multiplicity of infection of 60. Fluorescence images ( $20\times$  magnification) show more than 90% GFP-positive cells. (B) Quantitative RT-PCR analysis of LC3 mRNA levels in SBcl2-shNS and SBcl2-shLC3 melanoma cell lines. LC3 mRNA levels are shown relative to SBcl2-shNS after normalization to 18s rRNA. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD) ( $***P<0.001$ ). (C) Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM), intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>), HIF1 $\alpha$  and LC3 protein levels in whole-cell extracts from SBcl2-shNS and SBcl2-shLC3 melanoma cells incubated under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0032989.g007



Spain) in accordance with the Helsinki Declaration. Informed written consent was obtained from all donors of foreskins.

## Cell Culture

Human melanoma cell lines SBcl2 (radial growth phase) and WM164 (established from a metastasis) were provided by Dr Herlyn (The Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA) and cultured as described previously [61]. M000921 melanoma cell line (established from a metastasis) was provided by Dr Hoek (University Hospital of Zürich, Zürich, Switzerland) and cultured as reported earlier [62]. Primary human melanocytes were isolated from foreskins from independent donors and grown as described previously [63]. Primary cultures of melanocytes obtained from different single donors were used in this study (M330, M438, M13). For experiment in Figure S3, primary human melanocytes from Lonza (Basel, Switzerland) obtained from single donors were also used (NHEM). Primary cultures of melanocytes were used between passages 4–6, thus, a limited number of experiments could be carried out for each particular primary culture and therefore three different cultures were used.

## Reagents and Antibodies

The prolyl-4-hydroxylase inhibitor DMOG (N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine methyl ester, 250  $\mu$ M and 1 mM) was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA); EDTA (20 mM) and autophagy inhibitor Bafilomycin A1 (Baf.A1) (50 nM and 200 nM) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The metalloproteinase inhibitor GM6001 (10  $\mu$ M) and the proteasome inhibitor MG132 (1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M) were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Antibodies used were: extracellular PEDF (polyclonal; Bioproducts, West Palm Beach, FL, USA), intracellular PEDF (monoclonal; Chemicon, Billerica, MA, USA), HIF1 $\alpha$  (monoclonal; BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), HIF2 $\alpha$  polyclonal; Abcam, Cambridge, UK),  $\beta$ -tubulin (monoclonal; Sigma),  $\beta$ -actin (polyclonal; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), p62 (polyclonal; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), LC3 (polyclonal; Cell Signaling Technology) and Penta-His (monoclonal; Qiagen, Hilden, Germany).

## Hypoxia

Hypoxia conditions were achieved by incubating cells in a Hypoxystation H35 (Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK). Hypoxia was generated using a gas mixture of 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 94% N<sub>2</sub>. In Figure S4 anoxia was generated using a gas mixture of 0% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 95% N<sub>2</sub>. Alternatively, hypoxic like responses were mimicked by incubation with 250  $\mu$ M and 1 mM DMOG (Enzo Life Sciences).

## Conditioned Medium Preparation

For extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) detection, cells were cultured in basal medium. Later, conditioned medium (CM) was collected, centrifuged to eliminate cellular debris and treated with protease inhibitor PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride; Sigma). CM was concentrated 50 times using Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA, USA) devices with 10 kDa cut-off in a refrigerated centrifuge. Afterward, 15–30  $\mu$ l of CM was loaded per lane and used for western blot analysis.

## Metalloproteinase Assay

A total of 100 ng recombinant human PEDF (rhuPEDF) was mixed in 10  $\mu$ l of SBcl2 direct or concentrated CM and when indicated was treated with EDTA (Sigma) protease inhibitor at

37°C for 1 h. Reaction mixture was subjected to western blot for PEDF<sub>e</sub> detection.

## Western blotting

Whole-cell extracts were prepared by lysing the cells in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue and 100 mM DTT) containing protease and phosphatase inhibitors (10  $\mu$ g/ml leupeptin; 10  $\mu$ g/ml aprotinin; 10  $\mu$ g/ml sodium orthovanadate; 1  $\mu$ M PMSF (all from Sigma)). Whole-cell extracts or CM were separated by SDS-PAGE and subsequently transferred to PVDF membranes, and afterward, incubated with appropriate primary and horseradish-conjugated secondary antibodies and developed with ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Shown data are from a representative experiment that was confirmed on at least two independent experiments.

## EdU assay

DNA synthesis in primary human melanocytes (NHEM) and SBcl2 melanoma cell lines in normoxic vs hypoxic conditions was analyzed by the incorporation of 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) using Click-iT EdU Imaging Kit (Invitrogen, Paisley, UK) as indicated by the manufacturer. EdU-positive nuclei were counted in six independent fields using a TCS SP5 DM16000 spectral confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Nuclei were visualized using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

## RNA Extraction and Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted and purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Total RNA (1  $\mu$ g/sample) was reverse transcribed to cDNA (Improm-II reverse transcriptase; Promega, Madison, WI, USA) and 1  $\mu$ l of cDNA samples were used as template for amplification reactions carried out with the LC Fast Start DNA master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) following the manufacturer's instructions. Oligonucleotides used were: 28s rRNA sense 5'-cagtacgaatacagaccg-3' and antisense 5'-ggcaacaacacatcatcag-3';  $\beta$ -actin sense 5'-cccagagcaagagagg-3' and antisense 5'-gtccagacgcaggatg-3'; HIF1 $\alpha$  sense 5'-gtttactaaggacaagtacc-3' and antisense 5'-ttctgtttgtgaaggag-3'; and BNIP3 sense 5'-gtctggacggagtagc-3' and antisense 5'-ggccgacttgaccaat-3'. For detection of mRNA levels of 18s rRNA, PEDF, VEGF and LC3B, 1  $\mu$ l of cDNA samples were used as a template and amplified with ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using the following TaqMan probes (Applied Biosystems): 18 s rRNA (Hs99999901\_s1), PEDF (Hs00171467\_m1), LC3B (Hs00797944\_s1) and VEGF (Hs00173626\_m1). Average  $\pm$  standard deviation (SD). Values shown are from a representative experiment that was confirmed on at least three independent experiments.

## Lentivirus Production and Transduction of Target Cell Lines

Lentiviruses were produced and titered as previously reported [64]. For transduction of cell lines, lentiviruses were used at multiplicity of infection (MOI) of 40–60 in the presence of 8  $\mu$ g/ml polybrene (Sigma) for 8 h. Transduction efficiency was higher than 90%, and after 72 h, gene overexpression or knock-down was assessed.

## LC3 Overexpression

For LC3 overexpression we used the lentiviral vector pLV-EGFP-LC3 plasmid, kindly provided by Dr Soengas (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain).

## RNA Interference

HIF1 $\alpha$  and LC3 silencing was carried out using the lentiviral vector pGIPz containing shRNA<sup>mir</sup> sequence V2LHS\_132150 and V3LHS\_408637 respectively from Open Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Huntsville, AL, USA). Non-silencing shRNA<sup>mir</sup> sequence (shNS), with no homology to known mammalian genes was used as control, cloned in a pGIPz vector (Open Biosystems).

## Generation of PEDF-overexpressing Cell Lines

SBcl2 and M000921 melanoma cell lines were seeded on 21 cm<sup>2</sup> plates (10<sup>6</sup> cells) and 24 h later were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 8  $\mu$ g of pCEP4-PEDF plasmid (provided by Dr Bouck, Northwestern University, Chicago, IL, USA) or control pCEP4 plasmid. Forty-eight hours later cells were selected with 300  $\mu$ g/ml hygromycin B (Sigma) for two weeks, and then characterized for PEDF overexpression and used for further studies. pCEP4-PEDF plasmid contains PEDF cDNA without untranslated regions (5'UTR and 3'UTR) followed by a histidine tag at 3'.

## Plasmid Construction

Plasmids psiCHECK-3' PEDF and psiCHECK-3' GAPDH were generated by cloning the PEDF 3'-UTR or GAPDH 3'-UTR into the multiple cloning site of psiCHECK-2 vector (Promega) after Not I (Roche Applied Science) and Xho I (Invitrogen) digestion. The PEDF 3'-UTR and GAPDH 3'-UTR were amplified by PCR using the following pairs of oligonucleotide primers: for PEDF, primer sense 5'-cgctcgagatcccagtttaattatcc-3' (Xho I site underlined) and antisense 5'-cagcggccgctaacagaagtaggataa-3' (Not I site underlined); for GAPDH, primer sense 5'-cgctcgaggaccctggaccaccagc-3' (Xho I site underlined) and antisense 5'-cagcggccgctgtgagcacagggtac-3' (Not I site underlined).

## UTR Reporter Assay

Reporter assays were performed using the SBcl2 and M000921 melanoma cell lines. Cells were seeded on 24-well plates (10<sup>5</sup> cells/well), and 16 h later were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 300 ng of empty plasmid or the indicated reported construct. Four hours after transfection, medium was changed and cells cultured for 24 h. Afterward cells were cultured under normoxic (21% O<sub>2</sub>) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions in serum-free medium for additional 24 h. After the treatment, plates were kept frozen at -80°C until used. Analysis of Luciferase and Renilla was performed using the Dual Luciferase Reporter System (Promega) and a Lumat LB9507 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The Renilla activity was then normalized to Luciferase activity (constitutive expression). The results are average and standard deviation (SD) of the values obtained from two independent experiments in each melanoma cell line.

## Statistical Analysis

Statistical significance was assessed by two-tailed unpaired Student's *t*-test using GraphPad Instat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *P*-values < 0.05 were considered as significant.

## Supporting Information

**Figure S1 PEDF downregulation by different oxygen concentrations in melanoma cells.** Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM) and HIF1 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts from M000921 melanoma cell line incubated in normoxia (21% O<sub>2</sub>),

hypoxia (1% O<sub>2</sub>) and anoxia (0% O<sub>2</sub>) for 16 h and 24 h.  $\beta$ -actin was used as loading control. (TIF)

**Figure S2 Hypoxia downregulates PEDF in melanoma cells in the absence or presence of growth factor.** (A) Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM) from WM164 melanoma cell line. (B) Western blot analysis of intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>) and HIF1 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts from WM164 melanoma cell line. Cells were grown in basal medium with or without fetal bovine serum (2% FBS or 0% FBS, respectively); or without FBS in the presence of basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. (TIF)

**Figure S3 Hypoxia does not change DNA synthesis rate of primary human melanocytes and SBcl2 melanoma cells.** 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) incorporation of NHEM primary human melanocytes and SBcl2 melanoma cell grown in normoxic (21% O<sub>2</sub>) and hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions. Cells were grown in normoxic or hypoxic conditions for 16 h and 24 h incubated in the presence of 20  $\mu$ M EdU during the last 4 h. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD). (TIF)

**Figure S4 UTRs are not required for downregulation of PEDF levels under hypoxia in M000921 melanoma.** (A) Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM), intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>) and HIF1 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts from M000921-pCEP4 and M000921-pCEP4-PEDF melanoma cell line incubated under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. (B) Western blot analysis of PEDF<sub>e</sub> protein levels in 24 h CM and HIF1 $\alpha$  protein levels in whole-cell extracts from M000921 melanoma cell line incubated under hypoxia.  $\beta$ -tubulin was used as loading control. (C) UTR-reporter assay in M000921 melanoma cell line transfected with psiCHECK2-3'PEDF, psiCHECK2-3'GAPDH or empty vector psiCHECK2. After transfection, cells were incubated in hypoxia for 24 h. Renilla activity was normalized to luciferase activity expressed from internal control. psiCHECK2-3'GAPDH was used as a negative control. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD). (TIF)

**Figure S5 Hypoxia induces the autophagic phenotype in SBcl2 melanoma cells.** Quantification of SBcl2-GFP-LC3 with autophagic vacuoles after treatment of different times of hypoxia (1% O<sub>2</sub>) (4 h, 8 h, 16 h, 24 h and 48 h). Ten fields from each condition were assessed. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD) (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01). (TIF)

## Acknowledgments

The authors acknowledge with gratitude Dr. M. Gorospe and Dr. I. Lopez de Silanes for their advice in UTR reporter assay and bioinformatic search of RBP binding sites on PEDF's UTRs and Dr. P. Boya and Dr. M. Soengas for their advice on autophagy.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AFB JLO BJ. Performed the experiments: AFB JLO. Analyzed the data: AFB JLO BJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: LdP MJC. Wrote the paper: BJ AFB. Cloned the UTR reporters and performed UTR-reporter assays: VG. Contributed with the in silico search of HRE sites in SERPINF1: LP LdP.

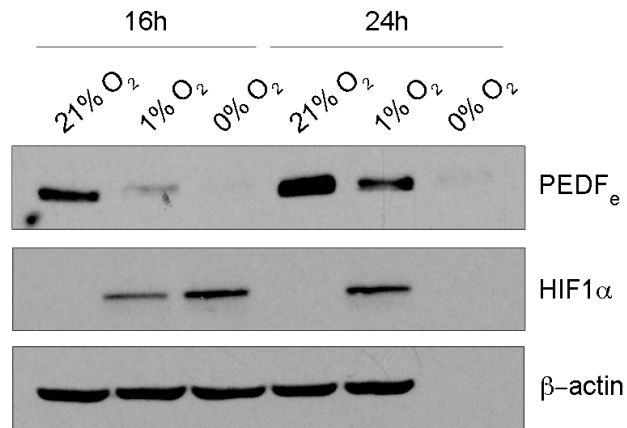


## References

- Tombran-Tink J (2005) The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. *Front Biosci* 10: 2131–2149.
- Tombran-Tink J, Barnstable CJ (2003) PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* 4: 628–636.
- Becerra SP (2006) Focus on Molecules: Pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Exp Eye Res* 82: 739–740.
- Ek ET, Dass CR, Choong PF (2006) Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* 5: 1641–1646.
- Filleur S, Nelius T, de Riese W, Kennedy RC (2009) Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem* 106: 769–775.
- Bouck N (2002) PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 8: 330–334.
- Tombran-Tink J (2010) PEDF in angiogenic eye diseases. *Curr Mol Med* 10: 267–278.
- Fernandez-Garcia NI, Volpert OV, Jimenez B (2007) Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* 85: 15–22.
- Broadhead ML, Dass CR, Choong PF (2009) In vitro and in vivo biological activity of PEDF against a range of tumors. *Expert Opin Ther Targets* 13: 1429–1438.
- Hoshina D, Abe R, Yamagishi SI, Shimizu H (2010) The role of PEDF in tumor growth and metastasis. *Curr Mol Med* 10: 292–295.
- Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, et al. (2004) Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 40: 252–259.
- Halin S, Wikstrom P, Rudolfsson SH, Stattin P, Doll JA, et al. (2004) Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. *Cancer Res* 64: 5664–5671.
- Qingyi Z, Lin Y, Junhong W, Jian S, Weizhou H, et al. (2009) Unfavorable prognostic value of human PEDF decreased in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: a differential proteomics approach. *Cancer Invest* 27: 794–801.
- Cai J, Parr C, Watkins G, Jiang WG, Boulton M (2006) Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 12: 3510–3517.
- Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, et al. (2003) Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol* 56: 277–282.
- Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, Cornwell M, Arensman RM, et al. (2003) Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg* 38: 336–342; discussion 336–342.
- Orgaz JL, Ladhani O, Hoek KS, Fernandez-Barral A, Mihic D, et al. (2009) 'Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma'. *Oncogene* 28: 4147–4161.
- Garcia M, Fernandez-Garcia NI, Rivas V, Carretero M, Escamez MJ, et al. (2004) Inhibition of xenografted human melanoma growth and prevention of metastasis development by dual antiangiogenic/antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Res* 64: 5632–5642.
- Ladhani O, Sanchez-Martinez C, Orgaz JL, Jimenez B, Volpert OV (2011) Pigment epithelium-derived factor blocks tumor extravasation by suppressing amoeboid morphology and mesenchymal proteolysis. *Neoplasia* 13: 633–642.
- Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, et al. (2003) Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 9: 774–780.
- Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, Shibaki A, Amano S, et al. (2004) Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol* 164: 1225–1232.
- Bedogni B, Powell MB (2009) Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 166–174.
- Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, et al. (2008) Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 10: 295–305.
- Rey S, Semenza GL (2010) Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 86: 236–242.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510–5514.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradford CA (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 $\alpha$ . *Gene Expr* 7: 205–213.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, et al. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood* 92: 2260–2268.
- Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337–1340.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, et al. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43–54.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, et al. (2001) HIF1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292: 464–468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, et al. (2001) Targeting of HIF-1 $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468–472.
- Wouters BG, van den Beucken T, Magagnin MG, Koritzinsky M, Fels D, et al. (2005) Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation. *Semin Cell Dev Biol* 16: 487–501.
- Wouters BG, Koritzinsky M (2008) Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 851–864.
- Rocha S (2007) Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* 32: 389–397.
- McCormick R, Buffa FM, Ragoussis J, Harris AL (2010) The role of hypoxia regulated microRNAs in cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 345: 47–70.
- Masuda K, Abdelmohsen K, Gorospe M (2009) RNA-binding proteins implicated in the hypoxic response. *J Cell Mol Med* 13: 2759–2769.
- Notari L, Miller A, Martinez A, Amaral J, Ju M, et al. (2005) Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2736–2747.
- Gross C, Buchwalter G, Dubois-Pot H, Cler E, Zheng H, et al. (2007) The ternary complex factor net is downregulated by hypoxia and regulates hypoxia-responsive genes. *Mol Cell Biol* 27: 4133–4141.
- Galban S, Kuwano Y, Pullmann R, Jr., Martindale JL, Kim HH, et al. (2008) RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 28: 93–107.
- Chang C, Werb Z (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11: S37–43.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52–67.
- Chen JL, Lin HH, Kim KJ, Lin A, Forman HJ, et al. (2008) Novel roles for protein kinase C $\delta$ -dependent signaling pathways in acute hypoxic stress-induced autophagy. *J Biol Chem* 283: 34432–34444.
- Chen JL, Lin HH, Kim KJ, Lin A, Ou JH, et al. (2009) PKC $\delta$  signaling: a dual role in regulating hypoxic stress-induced autophagy and apoptosis. *Autophagy* 5: 244–246.
- Pursiheimo JP, Rantanen K, Heikkinen PT, Johansen T, Jaakkola PM (2009) Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene* 28: 334–344.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, et al. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720–5728.
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, et al. (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117: 2805–2812.
- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, et al. (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23: 33–42.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, et al. (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285: 245–248.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437–443.
- Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, et al. (2006) Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 19: 290–302.
- Ortiz-Barahona A, Villar D, Pescador N, Amigo J, del Peso L (2010) Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res* 38: 2332–2345.
- Gorospe M, Tominaga K, Wu X, Fahling M, Ivan M (2011) Post-Transcriptional Control of the Hypoxic Response by RNA-Binding Proteins and MicroRNAs. *Front Mol Neurosci* 4: 7.
- van den Beucken T, Koritzinsky M, Wouters BG (2006) Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer Biol Ther* 5: 749–755.
- Kraggerud SM, Sandvik JA, Pettersen EO (1995) Regulation of protein synthesis in human cells exposed to extreme hypoxia. *Anticancer Res* 15: 683–686.
- Braunstein S, Karpisheva K, Pola C, Goldberg J, Hochman T, et al. (2007) A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell* 28: 501–512.
- Lopez de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M (2004) Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2987–2992.
- Lopez de Silanes I, Galban S, Martindale JL, Yang X, Mazan-Mamczarz K, et al. (2005) Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1. *Mol Cell Biol* 25: 9520–9531.
- Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, et al. (2005) The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 8: 443–454.

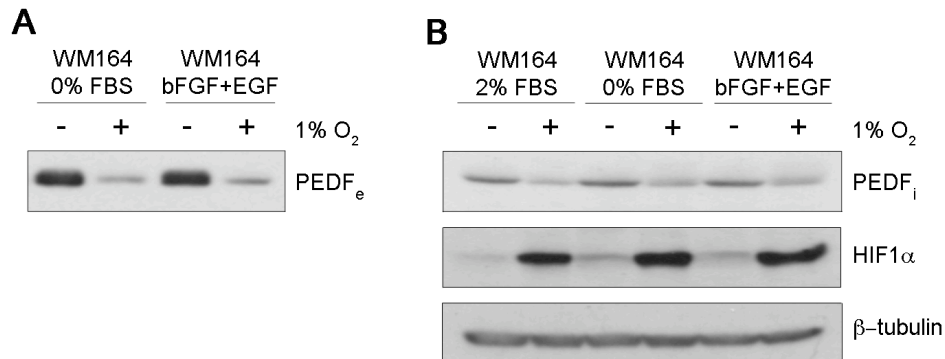
59. Adams AE, Chudnovsky Y, Khavari PA (2006) Oxygen deprivation provokes melanoma. *Nat Med* 12: 168–169.
60. Michaylira CZ, Nakagawa H (2006) Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer Biol Ther* 5: 476–479.
61. Li G, Schaider H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, et al. (2001) Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20: 8125–8135.
62. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, et al. (2008) In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 68: 650–656.
63. Garcia-Lopez MA, Barreiro O, Garcia-Diez A, Sanchez-Madrid F, Penas PF (2005) Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility. *J Invest Dermatol* 125: 1001–1009.
64. Punzon I, Criado LM, Serrano A, Serrano F, Bernad A (2004) Highly efficient lentiviral-mediated human cytokine transgenesis on the NOD/scid background. *Blood* 103: 580–582.

### Supplementary Figure 1.



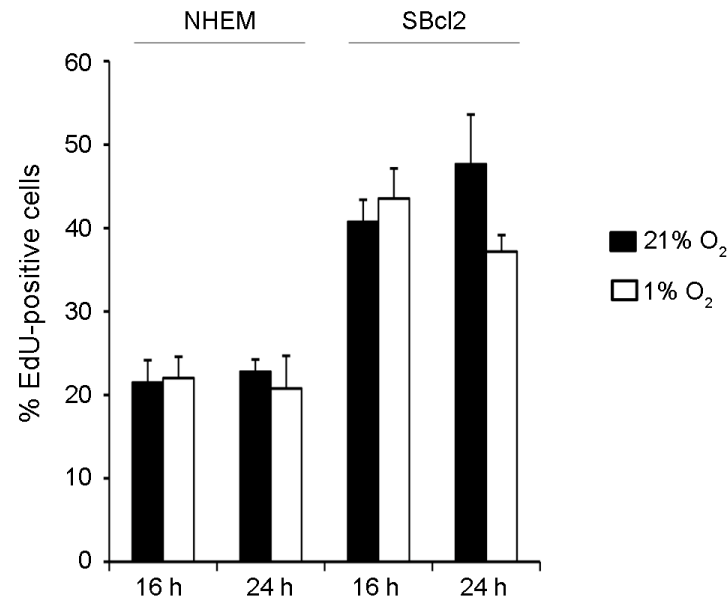
**Supplementary Figure 1. PEDF downregulation by different oxygen concentrations in melanoma cells.** *Western blot* analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM) and HIF1α protein levels in whole-cell extracts from M000921 melanoma cell line incubated in normoxia (21% O<sub>2</sub>), hypoxia (1% O<sub>2</sub>) and anoxia (0% O<sub>2</sub>) for 16 h and 24 h. β-actin was used as loading control.

## Supplementary Figure 2.



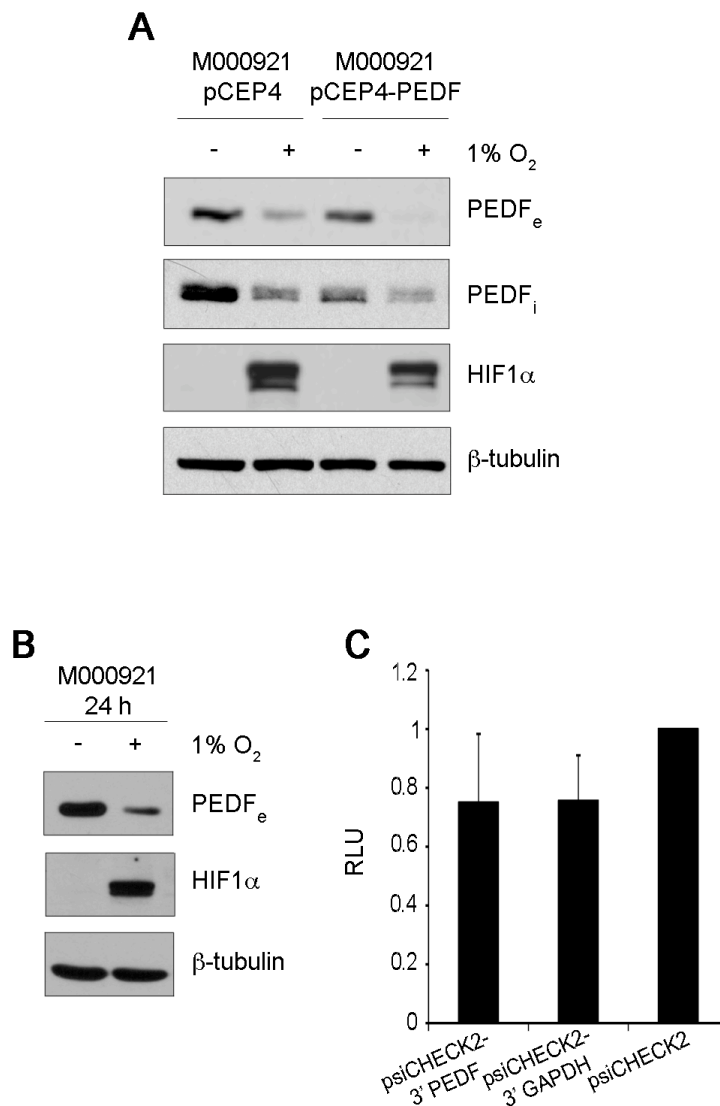
**Supplementary Figure 2. Hypoxia downregulates PEDF in melanoma cells in the absence or presence of growth factor.** (A) Western blot analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM) from WM164 melanoma cell line. (B) *Western blot* analysis of intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>) and HIF1α protein levels in whole-cell extracts from WM164 melanoma cell line. Cells were grown in basal medium with or without fetal bovine serum (2% FBS or 0% FBS, respectively); or without FBS in the presence of basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h. β-tubulin was used as loading control.

**Supplementary Figure 3.**



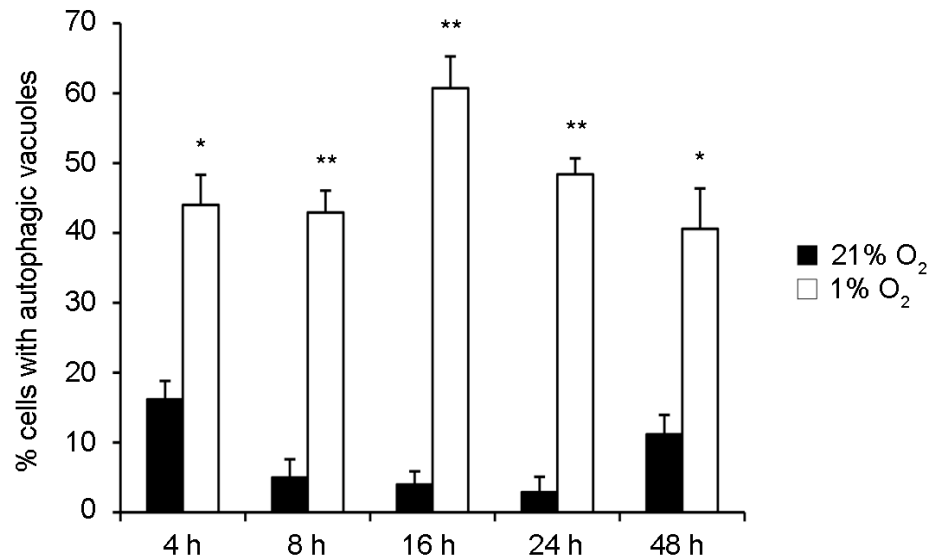
**Supplementary Figure 3. Hypoxia does not change DNA synthesis rate of primary human melanocytes and SBcl2 melanoma cells.** 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) incorporation of NHEM primary human melanocytes and SBcl2 melanoma cell grown in normoxic (21% O<sub>2</sub>) and hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions. Cells were grown in normoxic or hypoxic conditions for 16 h and 24 h incubated in the presence of 20 mM EdU during the last 4 h. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD).

# Supplementary Figure 4.



**Supplementary Figure 4. UTRs are not required for downregulation of PEDF levels under hypoxia in M000921 melanoma.** (A) *Western blot* analysis of extracellular PEDF (PEDF<sub>e</sub>) protein levels in conditioned medium (CM), intracellular PEDF (PEDF<sub>i</sub>) and HIF1α protein levels in whole-cell extracts from M000921-pCEP4 and M000921-pCEP4-PEDF melanoma cell line incubated under normoxia (21% O<sub>2</sub>) or hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h. β-tubulin was used as loading control. (B) *Western blot* analysis of PEDF<sub>e</sub> protein levels in 24 h CM and HIF1α protein levels in whole-cell extracts from M000921 melanoma cell line incubated under hypoxia. β-tubulin was used as loading control. (C) UTR-reporter assay in M000921 melanoma cell line transfected with psiCHECK2-3'PEDF, psiCHECK2-3'GAPDH or empty vector psiCHECK2. After transfection, cells were incubated in hypoxia for 24 h. Renilla activity was normalized to luciferase activity expressed from internal control. psiCHECK2-3'GAPDH was used as a negative control. Bars represent average ± standard deviation (SD).

### Supplementary Figure 5.



**Supplementary Figure 5. Hypoxia induces the autophagic phenotype in SBcl2 melanoma cells.** Quantification of SBcl2-GFP-LC3 with autophagic vacuoles after treatment of different times of hypoxia (1% O<sub>2</sub>) (4 h, 8 h, 16 h, 24 h and 48 h). Ten fields from each condition were assessed. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (SD) (\* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01).

## ORIGINAL ARTICLE

**‘Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma’**JL Orgaz<sup>1</sup>, O Ladhani<sup>2</sup>, KS Hoek<sup>3</sup>, A Fernández-Barral<sup>1</sup>, D Mihic<sup>4</sup>, O Aguilera<sup>1</sup>, EA Seftor<sup>5</sup>, A Bernad<sup>6</sup>, JL Rodríguez-Peralto<sup>7</sup>, MJC Hendrix<sup>5</sup>, OV Volpert<sup>2</sup> and B Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Universidad Autónoma de Madrid and Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Urology, Robert H Lurie Comprehensive Cancer Center, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, IL, USA; <sup>3</sup>Department of Dermatology, University Hospital of Zürich, Zürich, Switzerland; <sup>4</sup>Department of Pathology, University Hospital of Zürich, Zürich, Switzerland; <sup>5</sup>Children’s Memorial Research Center, Robert H Lurie Comprehensive Cancer Center, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, IL, USA; <sup>6</sup>Department of Regenerative Cardiology, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain and <sup>7</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, Madrid, Spain

**Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a multi-functional secreted glycoprotein that displays broad anti-tumor activity based on dual targeting of the tumor microenvironment (anti-angiogenic action) and the tumor cells (direct anti-tumor action). Here, we show that PEDF expression is high in melanocytes, but it is lost during malignant progression of human melanoma. Using a high-throughput analysis of the data from microarray studies of molecular profiling of human melanoma, we found that PEDF expression is lost in highly invasive melanomas. In paired cell lines established from the same lesion but representing the high and low extremes of malignant potential, abundant PEDF expression was restricted to the poorly aggressive counterparts. We used RNA interference to directly address the functional consequences of PEDF silencing. PEDF knockdown in poorly aggressive melanoma cell lines augmented migration, invasion and vasculogenic mimicry, which translated into an increased *in vivo* metastatic potential. PEDF interference also significantly enhanced the migratory and invasive capability of normal melanocytes and moderately increased their proliferative potential. Our results show that loss of PEDF enables melanoma cells to acquire an invasive phenotype and, therefore, modulation of this multifunctional factor could be critical for the malignant progression of human melanoma.**

*Oncogene* advance online publication, 21 September 2009; doi:10.1038/nc.2009.284

**Keywords:** PEDF; melanoma progression; vasculogenic mimicry; anti-angiogenic factors

**Introduction**

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a 50 kDa secreted glycoprotein from the serpin protease inhibitor (SERPIN) superfamily (Becerra, 1997). It was initially described in retinal pigment epithelial cells (Steele *et al.*, 1993), but later found to be expressed in several cell types (Bilak *et al.*, 1999, 2002; Sawant *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2004; Quan *et al.*, 2005).

Several biological activities have been ascribed to PEDF, including neurotrophic and neuroprotective properties, inhibition of proliferation and induction of differentiation and apoptosis. How PEDF controls this variety of biological responses remains largely unknown; it presumably binds to cell surface receptors to trigger various signaling cascades. Specific biological response could be determined through the expression of different PEDF receptors. There is evidence to support the existence of at least two different PEDF receptors, each, respectively, specific to neuronal (Alberdi *et al.*, 1999; Bilak *et al.*, 1999; Aymerich *et al.*, 2001) or endothelial cells (Yamagishi *et al.*, 2004; Filleur *et al.*, 2005). A PEDF receptor recently cloned and characterized from retina shows phospholipase A2 activity on PEDF binding (Notari *et al.*, 2006). The signaling pathways activated by PEDF regulate a number of key transcription factors including NF- $\kappa$ B (Yabe *et al.*, 2001), NFAT (Zaichuk *et al.*, 2004) and PPAR $\gamma$  (Ho *et al.*, 2007).

Although signaling cascades elicited by PEDF are poorly defined, its functional roles are well characterized in a number of tissues, under physiological and pathological conditions. The variety of cell types and functions targeted by PEDF indicates it is a critical mediator in multiple processes; its lack or deregulation likely contributes to a number of pathologies of the eye and central nervous system (Tombran-Tink and Barnstable, 2003). More recently, its potential role in cancer has been investigated in several tumor types (Ek *et al.*, 2006a; Fernandez-Garcia *et al.*, 2007).

PEDF is a potent endogenous inhibitor of angiogenesis, which determines proper vascularization in the adult retina and other eye compartments (Dawson

Correspondence: Associate Professor B Jiménez, Department of Biochemistry, Universidad Autónoma de Madrid-Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain.

E-mail: bjimenez@iib.uam.es

Received 23 February 2009; revised 22 July 2009; accepted 17 August 2009



*et al.*, 1999; Bouck, 2002). These anti-angiogenic properties prompted the study of PEDF anti-tumor activity. We (Garcia *et al.*, 2004; Fernandez-Garcia *et al.*, 2007) and others (Doll *et al.*, 2003; Ek *et al.*, 2006b) uncovered a complex mechanism underlying the anti-tumor effects of PEDF, which includes indirect anti-tumor action through inhibition of angiogenesis, direct inhibition of tumor cell migration, induction of apoptosis and differentiation in certain tumor cell types.

PEDF expression changes in the course of progression of different tumor types. A number of studies show inverse correlation between PEDF levels, grade and metastatic potential of prostate adenocarcinoma (Halin *et al.*, 2004), pancreatic adenocarcinoma (Uehara *et al.*, 2004), glioblastoma (Guan *et al.*, 2003), hepatocellular carcinoma (Matsumoto *et al.*, 2004) and Wilm's tumors (Abramson *et al.*, 2003).

Here, we analyze the expression of PEDF in human melanocytes and its regulation during their malignant conversion to melanoma. Defining melanoma progression is a difficult endeavor. It has evolved from the unidirectional transition models based on pathological criteria defining the radial growth phase (RGP), vertical growth phase (VGP) and metastatic phase of melanoma (Miller and Mihm, 2006) to the recently proposed reversible transition models based on the concept of molecular plasticity and reprogramming (Hendrix *et al.*, 2007). Molecular profiling studies strongly support this later model in which reversible changes between proliferative and invasive states, defined by molecular signatures, are at the core of melanoma progression (Hoek *et al.*, 2006, 2008). In this model, invasion from the growing primary tumor requires a transition from a proliferative to an invasive phenotype, which includes a number of changes enabling intravasation, survival in the circulation and extravasation at a distant site. In turn, reverse reprogramming from invasive to proliferative phenotype drives tumorigenesis at a distant site.

We have described earlier the anti-tumor and anti-metastatic effects achieved by retroviral transduction of PEDF in the aggressive human melanomas A375 and UCD-Mel-N (Garcia *et al.*, 2004). Here, we use a variety of approaches to analyze the changes in PEDF expression and the functional consequences of PEDF downregulation during malignant progression of human melanoma.

## Results

### *PEDF is produced at high levels by skin melanocytes*

Using primary cell cultures, we found that melanocytes and fibroblasts are the two cell types that express and secrete higher levels of PEDF in the skin. We detected similar high levels of PEDF by western blot and ELISA in conditioned medium (CM) from melanocytes and skin fibroblasts but not from keratinocytes and microvascular endothelial cells (Figures 1a and b). These results were consistent at mRNA level measured by quantitative RT-PCR, which showed that melanocytes

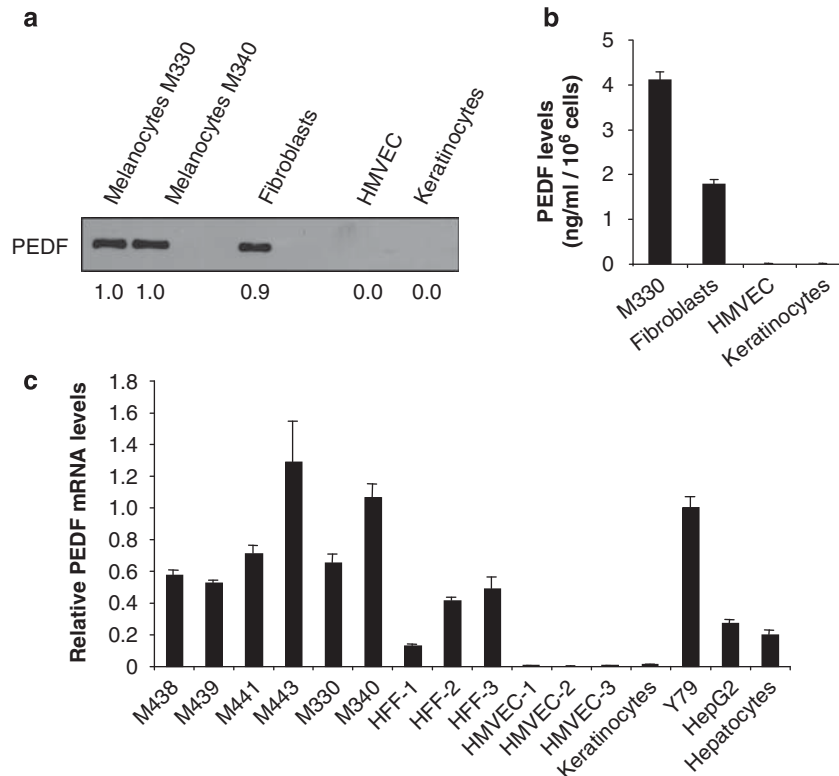
expressed 476- and 126-fold more PEDF mRNA than endothelial cells or keratinocytes, respectively (Figure 1c). Retinoblastoma cell line Y79 (Seigel *et al.*, 1994), the hepatocarcinoma cell line HepG2 and primary hepatocytes (Sawant *et al.*, 2004) were used as positive controls, showing that melanocytes expressed comparatively high levels of PEDF.

### *PEDF expression is lost in highly invasive melanomas*

To determine whether PEDF expression was modulated during melanoma genesis and progression, we measured PEDF expression in a small series of human melanoma cell lines representative of the RGP, VGP and metastatic phase of human melanoma. Western blot of CM showed that some RGP as well as VGP cell lines continue to express PEDF at levels similar to the primary cultures of melanocytes; however, nearly all metastatic cell lines tested lacked PEDF expression (Figure 2a). This was further confirmed by ELISA (Figure 2b) and correlated with levels of intracellular PEDF protein (Figure 2c) and PEDF mRNA levels measured by quantitative RT-PCR (Figure 2d). Mean PEDF mRNA level determined in primary melanocytes from six different donors was 24-fold higher than the mean of our collection of 10 melanoma cell lines ( $P < 0.001$ ). However, among the metastatic cell lines, we found some exceptions in which PEDF is expressed at significant levels, such as WM164 (Figure 2).

To further link decreased PEDF expression and melanoma aggressiveness we characterized molecular (E-cadherin (Li *et al.*, 2001b), N-cadherin (Li *et al.*, 2001a) and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) (Carreira *et al.*, 2006)) and functional (migration and invasion) markers of melanoma progression (Figures 2e–g). Among the VGP and metastatic cell lines tested, PEDF was expressed only in WM3248 and WM164 cell lines, which retained the expression of either E-cadherin or MITF, resulting in a lower migratory and invasive capability. However, this correlation was not observed in the two RGP cell lines selected. WM35 had lost PEDF expression but expressed E-cadherin and MITF and showed no migratory or invasive capability. Conversely, SBcl2 expressed high levels of PEDF despite its high migratory and invasive potential, which was consistent with the loss of MITF and E-cadherin.

Considering the inherent difficulty in classifying melanoma, and the variability in PEDF expression in our limited series of cell lines, we aimed to expand our analysis to larger melanoma sets. We used a high-throughput analysis of the data from microarray studies available at Gene Expression Omnibus (GEO) database, which includes large series of human melanoma cell lines. We first analyzed whether PEDF expression was significantly altered between melanocyte and melanoma. We compared the normalized expression of PEDF averaged between the 28 independent primary melanocyte cultures versus expression in each melanoma data set (described in Supplementary Methods). Table 1a shows that there is a consistent and statistically



**Figure 1** PEDF expression in primary cultures of skin cell types. (a) Western blot analysis of PEDF protein levels in 48 h conditioned media (CM) from human primary cultures of melanocytes (M330 and M340), fibroblasts, human microvascular endothelial cells (HMVEC) and keratinocytes. Numbers below blot show densitometry values normalized to melanocytes expression. (b) ELISA analysis of secreted PEDF protein levels in 24 h CM from human primary cultures of melanocytes (M330), fibroblasts, HMVEC and keratinocytes. Bars represent average  $\pm$  standard deviation (s.d.). (c) Quantitative RT-PCR analysis of PEDF mRNA levels in human primary cultures of melanocytes (M438, M439, M441, M443, M330, M340), fibroblasts (HFF1, HFF2, HFF3), endothelial cells (HMVEC1, HMVEC2, HMVEC3), keratinocytes, Y79 retinoblastoma cell line, HepG2 hepatocarcinoma cell line and hepatocytes. PEDF mRNA levels are shown relative to Y79 after normalization to 18S rRNA. Bars represent average  $\pm$  s.d.

significant downregulation of PEDF in the four melanoma cell line collections.

The attempts to classify melanoma according to molecular profiling have introduced a number of relevant concepts. The study by Hoek *et al.* (2006) identified molecular signatures differentiating weakly versus strongly invasive cohorts. We applied this classification to the four melanoma cell line series above, and we questioned whether PEDF was differentially expressed in the two cohorts. Figure 3 shows that PEDF is expressed at lower levels in the strongly invasive cohort in all series; this decrease was statistically significant in Mannheim and Philadelphia series (Table 1b).

Despite the general trend toward PEDF loss during melanoma progression, we found some metastatic melanoma cell lines that retained high PEDF levels. We then hypothesized that (i) PEDF expression is reprogramed during the metastatic process and (ii) high PEDF expression is typical of the poorly invasive sub-population within a metastatic lesion. To verify this hypothesis, we used paired cell lines representing the extreme phenotypes (highly and poorly aggressive) derived from an abdominal wall metastasis of a

cutaneous human melanoma (Seftor *et al.*, 2005). Figure 4a shows morphological differences between the two cell lines, spindle-shaped poorly aggressive C81-61 and epithelioid highly aggressive C8161. Both C8161 and C81-61 expressed N-cadherin but have lost E-cadherin expression (Figure 4b); however their aggressive traits differed significantly. C81-61 was less migratory (Figure 4c left) and invasive (Figure 4c right), and grew poorly in soft agar (Figure 4d). Accordingly, MITF expression was higher in the poorly aggressive C81-61 than in highly aggressive C8161 (Figure 4e). Analysis of PEDF expression showed a striking difference between the two cell lines: poorly aggressive C81-61 expressed PEDF at levels comparable to those in melanocytes, whereas PEDF was undetectable in highly aggressive C8161, as was shown by western blot (Figure 4f left) and ELISA (Figure 4f middle) of CM and western blot of cell extracts (Figure 4f right). Similarly, PEDF mRNA was high in C81-61 but undetectable in C8161 (Figure 4g).

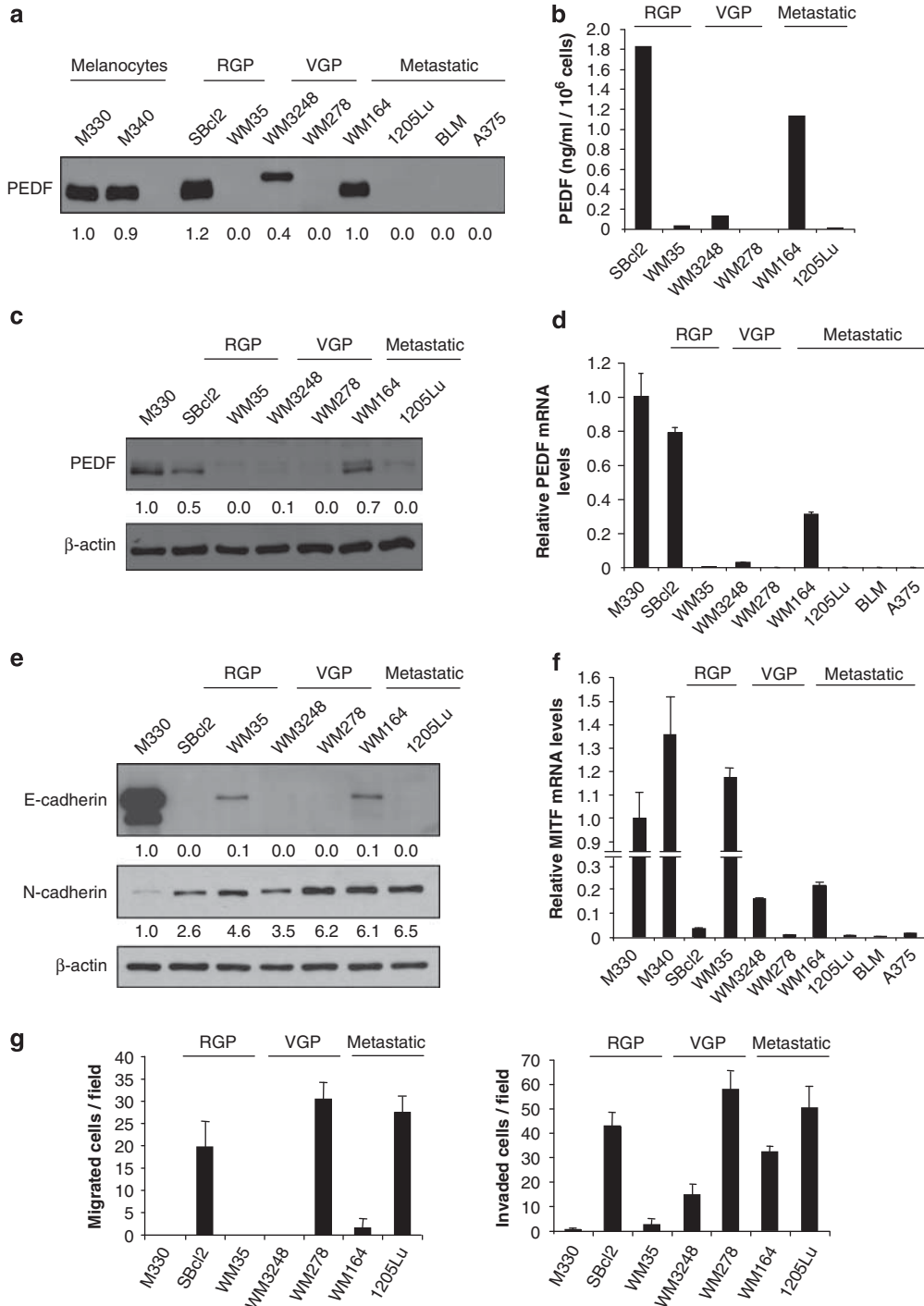
Heterogeneity of PEDF expression within a metastatic lesion was confirmed by immunohistochemistry in biopsies of lymph node and dermal metastasis. PEDF expression was highly positive in one out of five cases for

both types of metastasis and all positive cases showed heterogeneous staining (Supplementary Figure 1).

*PEDF silencing augments migratory capability, metastatic potential and vasculogenic mimicry of poorly aggressive melanoma cell lines*

To establish a causal connection between PEDF expression and melanoma aggressiveness and invasiveness, we explored the functional consequences of PEDF silencing

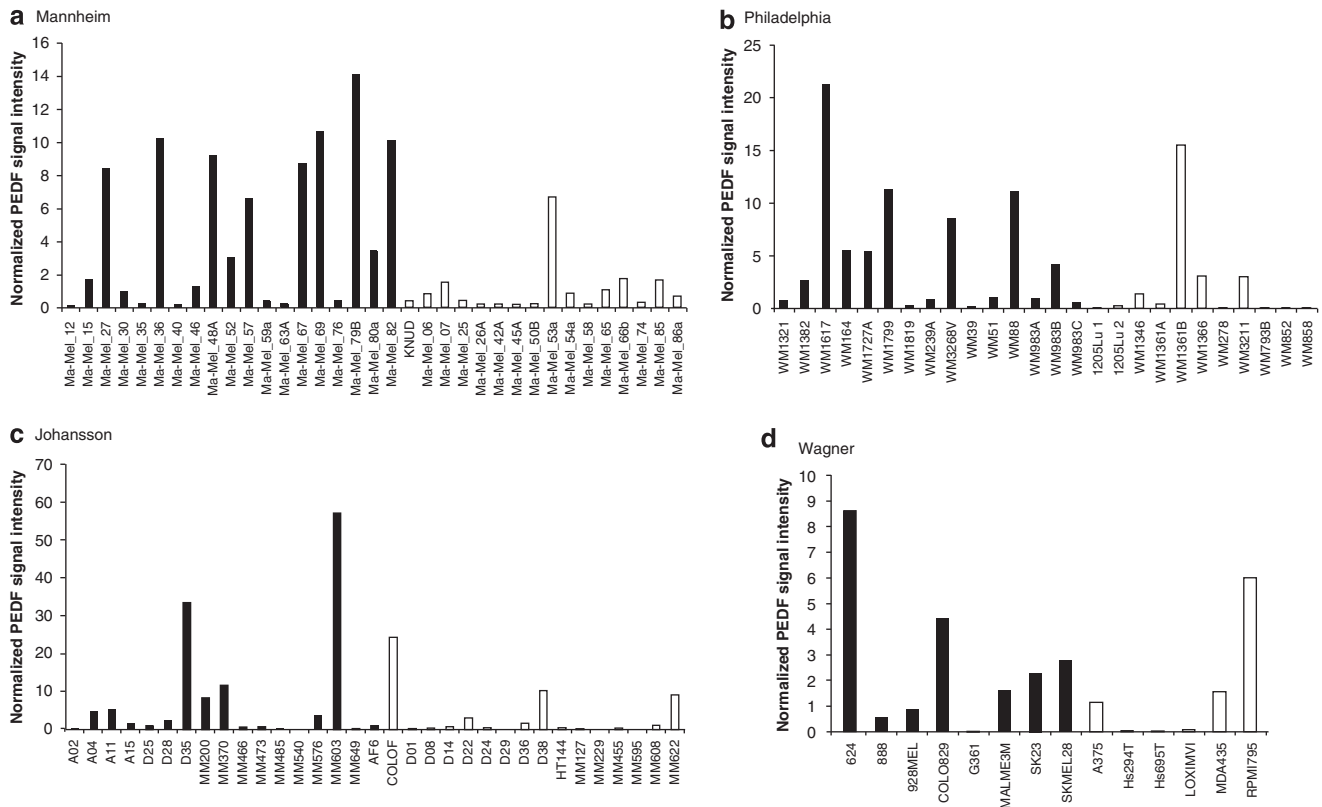
in melanoma cell lines. We knocked down PEDF in poorly aggressive SBcl2 and WM164 melanoma cell lines using shRNA<sup>mir</sup> to PEDF (shPEDF) delivered by lentiviral transduction (Figure 5a). Non-silencing (NS) shRNA<sup>mir</sup> was used as control. PEDF silencing was quantified by western blot (Figure 5b) and ELISA (Figure 5c) of CM and quantitative RT-PCR (Figure 5d). Basal and induced migration was increased on interference of PEDF in SBcl2 and WM164 cells (Figure 5e). Moreover, invasion of SBcl2 was also



significantly increased by PEDF silencing (Figure 5f). To evaluate whether the increase in migratory ability translated into augmented metastatic potential, we tested the capacity of SBcl2-NS versus SBcl2-shPEDF to form metastatic colonies *in vivo*. Interestingly, lungs of SBcl2-shPEDF-injected mice showed a higher number of microscopic GFP-positive tumor colonies compared with the lungs from SBcl2-NS-injected mice (Figure 5g, upper panels). Histological examination confirmed the presence of larger metastases in SBcl2-

shPEDF colonized lungs (Figure 5g, lower panels). Quantitative analysis showed a significant increase in the number of colonies because of PEDF silencing (Figure 5g, right).

We also examined the effect of PEDF interference in the poorly aggressive melanoma cell line C81-61. Despite effective PEDF silencing (Figure 6a), there was no significant increase in migration (data not shown). As mentioned earlier, melanoma cells possess extreme plasticity and can be reprogrammed to form



**Figure 3** PEDF expression in series of melanoma cell lines from microarray studies. Analysis of PEDF expression using microarray gene expression data of Mannheim (a), Philadelphia (b), Johansson (c) and Wagner (d) series of melanoma cell lines. Cell lines were classified by their gene signature into weakly (filled bars) and strongly invasive (empty bars) cohorts as described in Supplementary Methods. Normalized PEDF signal intensity is plotted across the sample set. Average and s.d. values and statistical significance are described in Table 1b.

**Figure 2** PEDF expression in RGP, VGP and metastatic human melanoma cell lines compared with normal human melanocytes. (a) Immunoblotting analysis of PEDF protein levels in 48 h CM from M330 and M340 primary melanocytes; SBcl2 and WM35 RGP melanoma cell lines; WM3248 and WM278 VGP melanoma cell lines; and WM164, 1205Lu, BLM and A375 metastatic melanoma cell lines. Numbers below blot show densitometry values normalized to M330 melanocytes expression. (b) ELISA analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 and 1205Lu melanoma cell lines. Bars represent average  $\pm$  s.d. (c) Immunoblotting analysis of intracellular PEDF protein levels in whole-cell extracts from M330 primary melanocytes and SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 and 1205Lu melanoma cell lines.  $\beta$ -actin was used as loading control. Numbers below blot show densitometry values normalized to melanocytes expression after correction for loading. (d) Quantitative RT-PCR analysis of PEDF mRNA levels in M330 primary melanocytes and SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164, 1205Lu, BLM and A375 melanoma cell lines. PEDF mRNA levels are shown relative to melanocytes after normalization to 18S rRNA. Bars represent average  $\pm$  s.d. (e) Immunoblotting analysis of E-cadherin and N-cadherin levels in whole-cell protein extracts from M330 primary melanocytes and SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 and 1205Lu melanoma cell lines.  $\beta$ -actin was used as loading control. Numbers below blots show densitometry values normalized to melanocytes expression after correction for loading. (f) Quantitative RT-PCR analysis of MITF mRNA levels in M330 and M340 primary melanocytes and SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164, 1205Lu, BLM and A375 melanoma cell lines. MITF mRNA levels are shown relative to melanocytes after normalization to 18S rRNA. Bars represent average  $\pm$  s.d. (g) Migration (left panel) and invasion (right panel) assays of M330 primary melanocytes and SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 and 1205Lu melanoma cell lines toward 10% fetal bovine serum (FBS) for 8 h (migration) or 24 h (invasion).

**Table 1** Differences in PEDF expression between melanocytes and melanoma cell line collections and within melanoma cell line collections

(a) Differences in PEDF expression between melanocyte and melanoma cell line collections

Data set	Average	s.d.	Fold	Statistical test
Melanocyte	3.58	3.25		
Mannheim	1.45	1.98	2.48	Mann–Whitney, $P < 0.001$
Melanocyte	3.44	3.13		
Philadelphia	0.84	1.22	4.10	Mann–Whitney, $P < 0.0001$
Melanocyte	5.47	4.97		
Johansson	2.63	5.03	2.08	Mann–Whitney, $P < 0.0001$
Melanocyte	2.27	2.06		
Wagner	0.61	0.82	3.75	Mann–Whitney, $P < 0.001$

(b) Differences in PEDF expression between weakly and strongly invasive cohorts of melanoma cell lines

Data set	Weakly invasive		Strongly invasive		Fold	Statistical test
	Average	s.d.	Average	s.d.		
Mannheim	4.74	4.67	1.05	1.59	4.50	Mann–Whitney, $P < 0.05$
Philadelphia	4.99	5.94	2.16	4.58	2.31	Mann–Whitney, $P < 0.05$
Johansson	8.21	15.48	3.11	6.27	2.64	Mann–Whitney, not significant ( $P = 0.14$ )
Wagner	2.65	2.79	1.48	2.31	1.78	<i>t</i> -test, not significant ( $P = 0.42$ )

Abbreviation: PEDF, pigment epithelium-derived factor.

Note: Although 'Melanocyte' refers to the same collection of cultures in each case, the normalized expression measurement is affected by the melanoma cell line dataset with which it is normalized and therefore the average value for PEDF should not be expected to remain static.

vessel-like structures, a phenomenon termed vasculogenic mimicry (VM) (Hendrix *et al.*, 2003). Highly aggressive C8161 cells form vasculogenic networks, unlike the poorly aggressive C81-61 that adhere poorly to collagen matrix and fail to form cord-like structures (Seftor *et al.*, 2005). Interestingly, PEDF knockdown enabled C81-61 cells to spread out and form circular vasculogenic structures in 3D collagen matrix, indicative of VM, whereas NS shRNA<sup>mir</sup> had no effect (Figure 6b). C81-61-shPEDF cells were not able to form colonies in the lungs 3 weeks after tail vein injection (Figure 6c). Interestingly, PEDF knockdown provided signals that allowed the melanoma cells to form branching, vessel-like structures and large lacunae containing red blood cells (Figure 6c top). Immunostaining for GFP confirmed that these structures were formed by melanoma cells (Figure 6c bottom). However, PEDF knockdown significantly increased the ability of poorly aggressive C81-61 cells implanted subcutaneously to form spontaneous metastasis to the lung after 9 weeks (Supplementary Figure 2a)

We also over-expressed PEDF in the highly aggressive and invasive counterpart of C81-61 melanoma cell line, C8161. Efficient PEDF lentiviral transduction of C8161 cells was confirmed by GFP expression (Figure 6d, left) and analysis of PEDF expression by ELISA of CM (Figure 6d, middle) and quantitative RT-PCR (Figure 6d, right). In agreement with our previous observations (Garcia *et al.*, 2004), PEDF over-expression reduced the number of surface lung metastases in a lung colonization assay (Figure 6e) and the ability to form spontaneous metastases from a subcutaneous primary tumor (Supplementary Figure 2b). Moreover, it reduced the formation of circular cords in 3D collagen matrix *in vitro* (Figure 6f), as well as the presence of blood-filled lacunae *in vivo* (Figure 6e, lower panels),

indicative of VM, typical of C8161 cells (Hendrix *et al.*, 2003; van der Schaft *et al.*, 2004).

#### *PEDF silencing augments migration, invasion and proliferation of melanocytes*

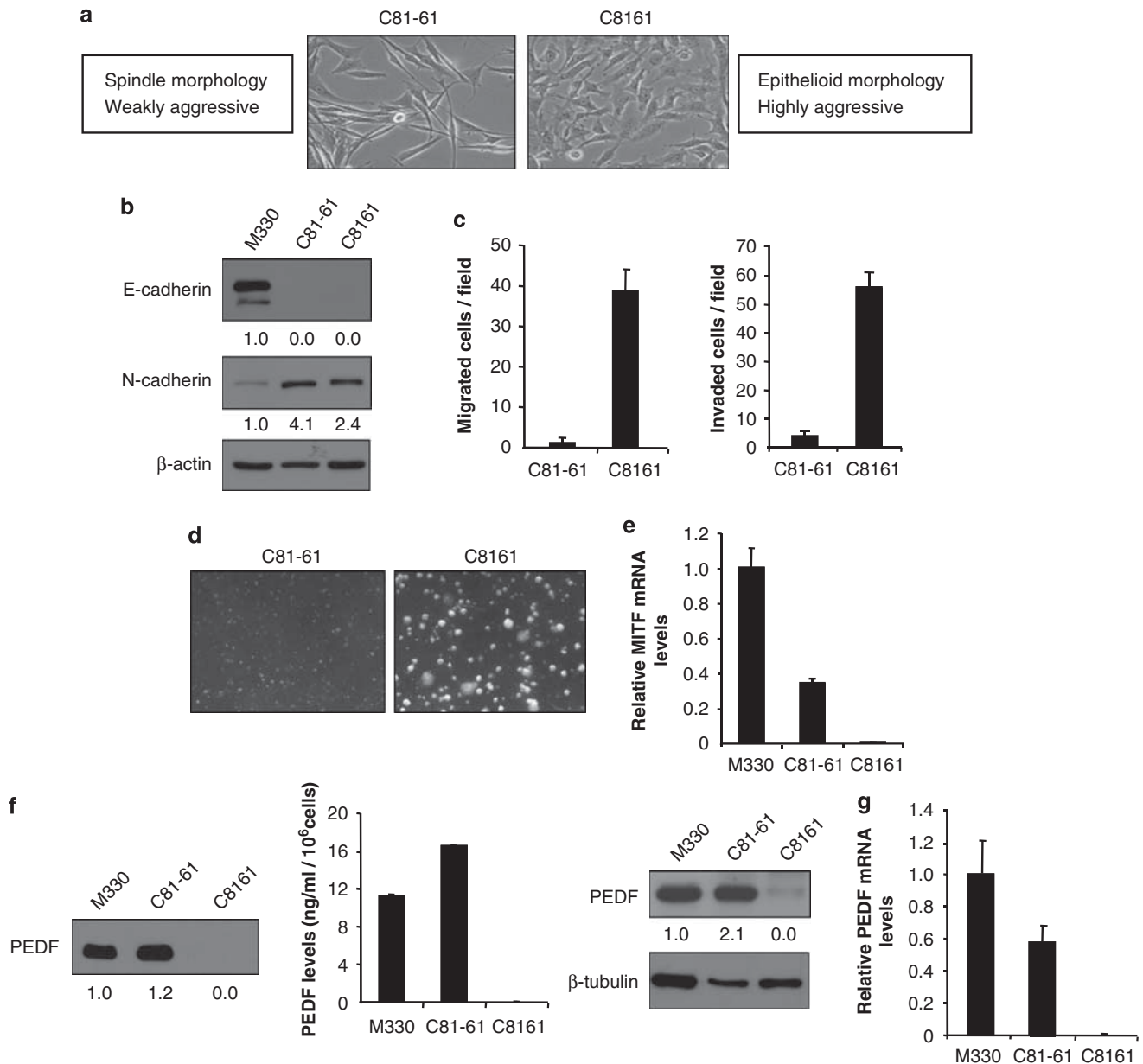
As PEDF is highly expressed in melanocytes, we explored whether PEDF could have a direct functional role in these cells regulating their ability to migrate, invade and proliferate. PEDF knockdown in melanocytes (Figures 7a-c) increased migration and invasion toward a variety of inducers (Figures 7d and e). Furthermore, the proliferation of melanocytes was moderately increased by PEDF knockdown (Figure 7f).

PEDF silencing did not alter the levels of E-cadherin protein and mRNA (Supplementary Figure 3). Although we found a reduction in MITF mRNA expression on PEDF knockdown (Supplementary Figure 4), this result was not reproduced in a statistically significant number of experiments; MITF levels were reduced in three out of nine independent experiments using primary cultures from different donors. A reduction in MITF mRNA after PEDF silencing was also seen in the poorly aggressive melanoma cell lines WM164, C81-61 and M010817, but did not reproduce in a significant number of experiments (Supplementary Figure 4). Thus, it is unlikely that the functional effects of PEDF silencing in melanocytes were mediated by E-Cadherin or MITF.

#### Discussion

Our understanding of melanoma biology remains incomplete despite several decades of intense research (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). The role of epigenetic factors and





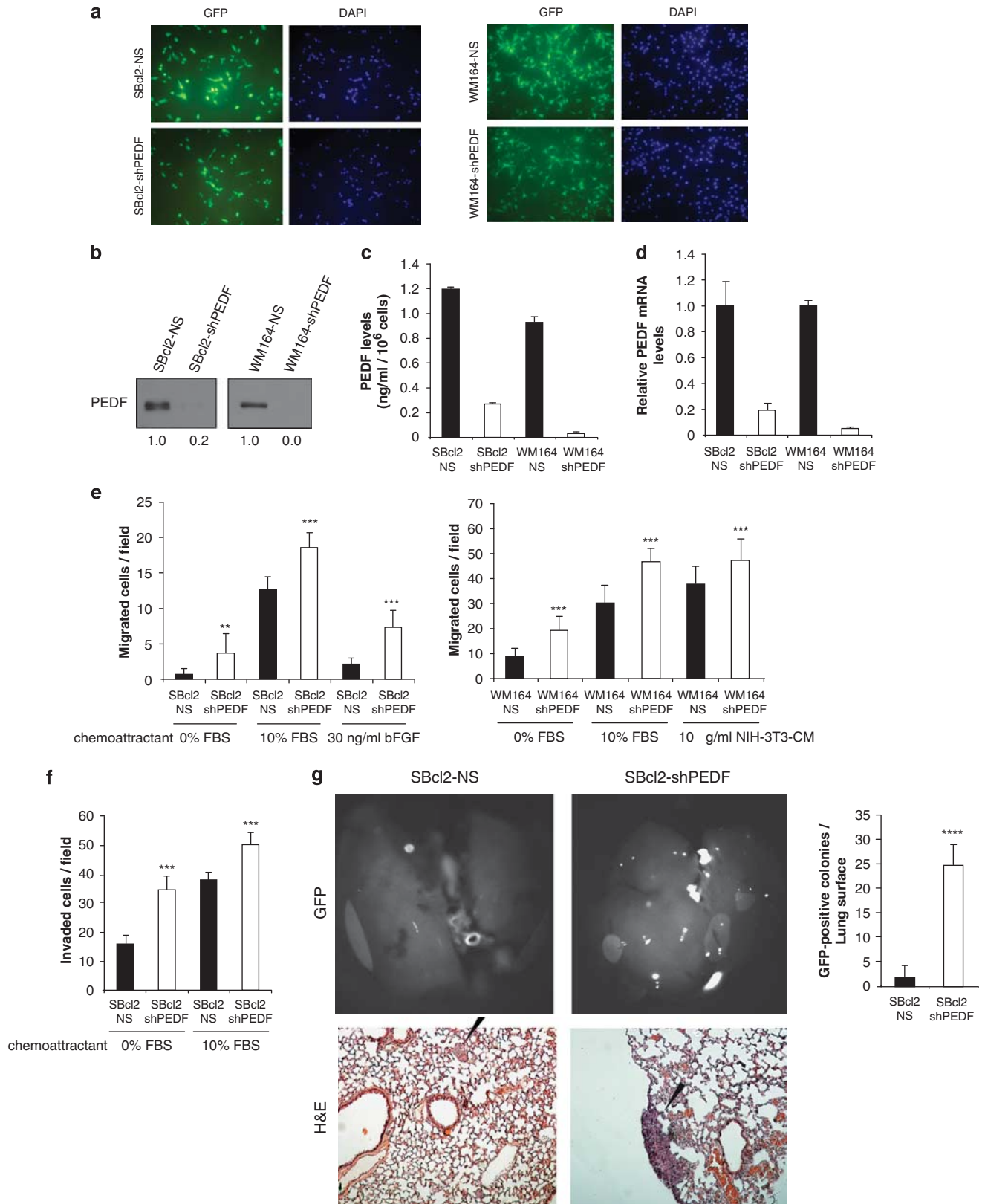
**Figure 4** PEDF expression in melanoma cell lines representing extreme phenotypes (poorly and highly aggressive) derived from an abdominal wall metastasis of a cutaneous human melanoma. **(a)** Phase-contrast images of C81-61 (poorly aggressive) and C8161 (highly aggressive) melanoma cell lines. **(b)** Immunoblotting analysis of E-cadherin and N-cadherin levels in whole-cell protein extracts from M330 primary melanocytes and C81-61 and C8161 melanoma cell lines. β-actin was used as loading control. Numbers below blots show densitometry values normalized to melanocytes expression after correction for loading. **(c)** Migration (left panel) and invasion (right panel) assays of C81-61 and C8161 melanoma cell lines toward 10% FBS for 8 h (migration) or 24 h (invasion). **(d)** Phase-contrast images of C81-61 and C8161 melanoma cell lines growing in soft agar after 11 days of culture. **(e)** Quantitative RT-PCR analysis of MITF mRNA levels in M330 primary melanocytes and C81-61 and C8161 melanoma cell lines. MITF mRNA levels are shown relative to melanocytes after normalization to 18S rRNA. Bars represent average ± s.d. **(f)** Immunoblotting analysis of PEDF protein levels in 48 h CM from M330 primary melanocytes and C81-61 and C8161 melanoma cell lines. Numbers below blot show densitometry values normalized to melanocytes expression (left panel). ELISA analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from M330 primary melanocytes and C81-61 and C8161 melanoma cell lines. Bars represent average ± s.d. (middle panel). Immunoblotting analysis of intracellular PEDF protein levels in whole-cell extracts from M330 primary melanocytes and C81-61 and C8161 melanoma cell lines. β-tubulin was used as loading control. Numbers below blot show densitometry values normalized to melanocytes expression after correction for loading (right panel). **(g)** Quantitative RT-PCR analysis of PEDF mRNA levels in M330 primary melanocytes and C81-61 and C8161 melanoma cell lines. PEDF mRNA levels are shown relative to melanocytes after normalization to 18S rRNA. Bars represent average ± s.d.

tumor microenvironment as major driving forces in melanoma progression has been presented with increasing molecular detail in recent years (Hendrix *et al.*, 2007).

Here, we describe the regulation of PEDF, a multi-functional endogenous factor, during melanoma progression and its functional consequences. We have

demonstrated earlier that PEDF over-expression has multiple biological effects that overall profoundly affect melanoma aggressiveness by abrogating migration,

driving apoptosis in melanoma cells under stress conditions, and acting as a potent anti-angiogenic factor (Garcia *et al.*, 2004). These results were extrapolated to



other tumor types by a number of subsequent studies, which strongly support the potential use of PEDF for cancer therapy.

Here, we show that PEDF is produced at high levels by melanocytes in the skin. Originally PEDF was found at high levels in retinal pigment epithelial cells. Although both melanocytes and retinal pigment epithelial cells are pigment producing cells, they have different developmental origin and display distinct biological roles (Sato and Yamamoto, 2001). PEDF has multiple functions, some of which are cell type specific, such as neurotrophic or neuroprotective properties, whereas others, including inhibition of proliferation, migration and induction of apoptosis, affect multiple cell types. The functional role of PEDF in pigment producing cells has not yet been addressed. Here, we show that knockdown of endogenous PEDF expression in melanocytes translates into increased migration, invasion and proliferation, suggesting a role for PEDF in melanocyte homeostasis. Further studies comparing PEDF expression in highly migratory neural crest precursors and in less migratory mature melanocytes in the epidermis, may provide valuable clues into the functional roles of PEDF in pigment producing cells.

PEDF is expressed at high levels in a significant percentage of melanoma lesions although the high variance found in its expression levels suggested that regulation of PEDF expression may underlie some aspects of melanoma progression. In our study, we used several approaches to establish a robust conclusion concerning PEDF loss during melanoma progression and its functional consequences.

We used the information from high-throughput microarray analysis available at GEO databases to analyze possible correlation of PEDF expression with molecular staging of melanoma. The comparison of normalized data from several independent studies showed that PEDF was significantly downregulated in melanoma cell lines compared with melanocyte cultures. This analysis also showed that PEDF expression was highly variable between melanoma cell lines. We therefore looked for a sub-classification that would reflect the principle underlying PEDF variation. Gene expression profiling has been used to define molecular taxonomy of

human melanoma, which reflects certain functional criteria. Hoek *et al.* (2008) used the combination of gene expression profiling and functional tests to introduce a hypothesis in which melanoma cells are classified into weakly or strongly invasive, and bidirectional switch between these phenotypes drives progression. We found that high PEDF expression was characteristic of weakly invasive melanoma cell lines.

On the other hand, our study suggested that PEDF expression in melanoma cells is subject to plasticity. This was supported by our results in paired cell lines established from a single lesion, in which PEDF expression was restricted to the poorly aggressive counterpart. Therefore, a single melanoma lesion may contain PEDF-positive and -negative cells and reprogramming of PEDF expression may reflect the reversible transitions between proliferative and invasive states required during the metastatic process. In keeping with this hypothesis, melanoma biopsies from the lymph node and dermal metastases showed heterogeneous expression of PEDF and in one out of five cases PEDF was expressed at high levels.

To assess the functional consequences of PEDF loss during malignant progression of human melanoma we used a direct molecular analysis based on RNA interference. Silencing of endogenous PEDF expression in poorly aggressive human melanoma cell lines increased their migratory and invasive ability and translated into a higher metastatic potential *in vivo*. Additional traits modulated by PEDF, such as the ability to proliferate and induce angiogenesis (Garcia *et al.*, 2004), could also contribute to the observed increased metastatic potential.

Interestingly, PEDF silencing increased VM, one of the phenomena reflecting melanoma plasticity during the invasion-metastasis cascade (Hendrix *et al.*, 2003). The ability of PEDF to curtail VM is especially noteworthy, as it was unaffected by established angiogenesis inhibitors such as anginex, TNP-470 and endostatin (van der Schaft *et al.*, 2004).

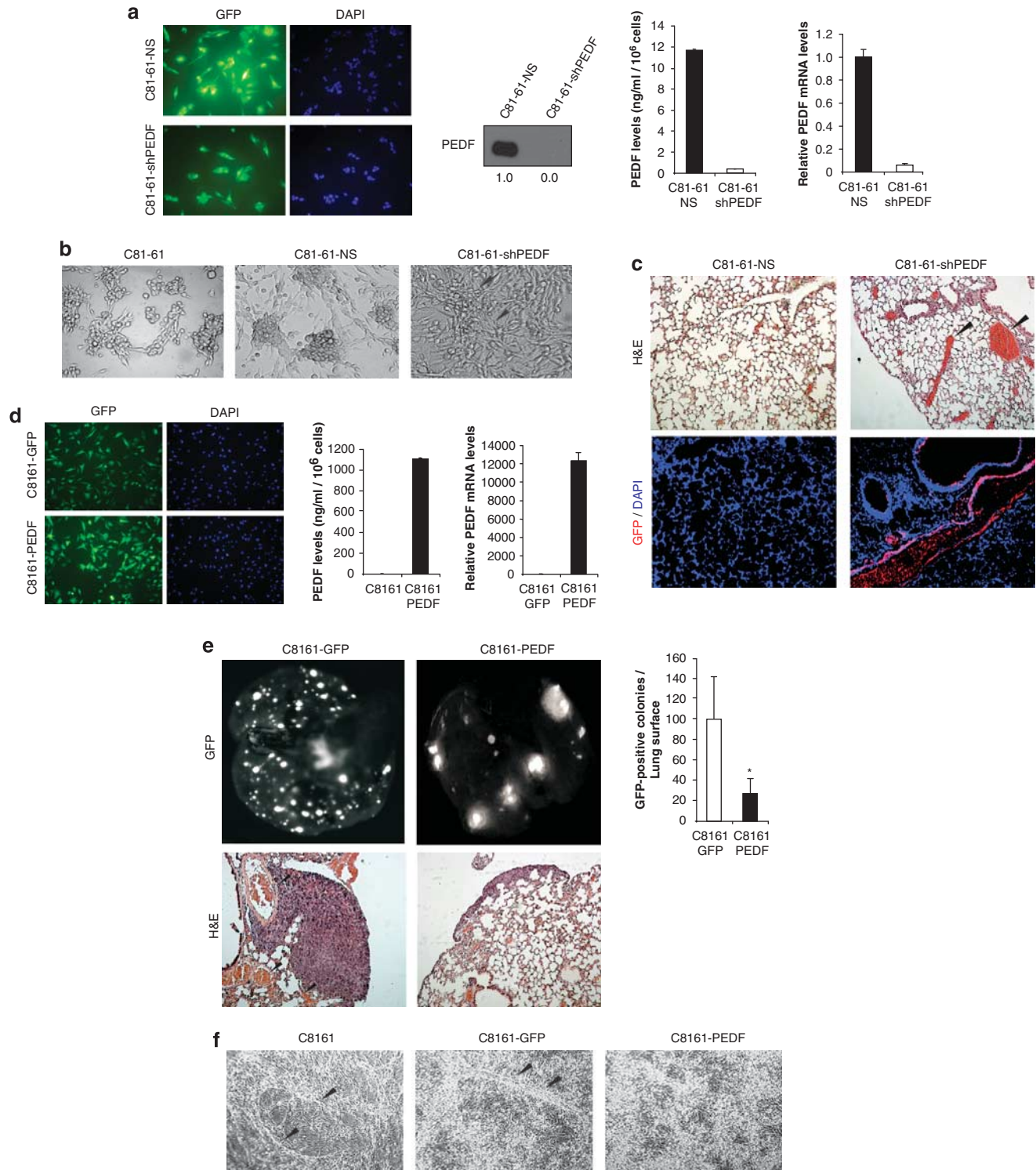
Possible regulatory mechanisms underlying the changes in PEDF expression during transformation and malignant progression of melanoma are presently unknown, although there are several likely candidates.

**Figure 5** PEDF interference in poorly aggressive melanoma cell lines increases cell migration, invasion and metastatic potential. (a) Transduction efficiency of SBcl2 (left panels) and WM164 (right panels) melanoma cell lines after infection with non-silencing (NS) or shRNA<sup>mir</sup> to PEDF (shPEDF) lentivirus at a multiplicity of infection (MOI) of 10 (SBcl2) or 60 (WM164). Fluorescence images show more than 95% GFP-positive cells. Nuclei were visualized by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. (b) Immunoblotting analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from SBcl2-NS, SBcl2-shPEDF (left), WM164-NS and WM164-shPEDF (right) melanoma cell lines. Numbers below blots show densitometry values normalized to NS cell lines expression. (c) ELISA analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from SBcl2-NS, SBcl2-shPEDF, WM164-NS and WM164-shPEDF melanoma cell lines. Bars represent average  $\pm$  s.d. (d) Quantitative RT-PCR analysis of PEDF mRNA levels in SBcl2-NS, SBcl2-shPEDF, WM164-NS and WM164-shPEDF melanoma cell lines. PEDF mRNA levels are shown relative to NS cell lines after normalization to GAPDH. Bars represent average  $\pm$  s.d. (e) Migration assays of SBcl2-NS and SBcl2-shPEDF (left) and WM164-NS and WM164-shPEDF (right) melanoma cell lines toward 10% FBS, 30 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) or 10  $\mu$ g/ml CM from NIH-3T3 cells for 8 h (SBcl2) or 16 h (WM164). Statistical significance was determined by ANOVA test using Tukey-Kramer post-test (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). (f) Invasion assay of SBcl2-NS and SBcl2-shPEDF melanoma cell lines toward 10% FBS for 24 h. Statistical significance was determined by ANOVA test using Tukey-Kramer post-test (\*\*\* $P < 0.001$ ). (g) Lung colonization assay of SBcl2-NS and SBcl2-shPEDF melanoma cell lines. Lung metastases were visualized by fluorescence imaging. Fluorescence images of the lungs (top, left) and quantification of surface metastases (top, right) are shown. Bars represent average  $\pm$  s.d., and statistical significance was determined by Student's *t*-test (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Bottom panels show hematoxylin/eosin (H&E) staining of lung sections, and microscopic metastases are pointed by black arrows.



Regulators of neovascularization, such as PEDF, are controlled through the gain of oncogenes and the loss of tumor suppressor genes (Bouck, 1990). PEDF is a direct target of p53 family members in colorectal cancer cell lines (Sasaki *et al.*, 2005). Decreased PEDF expression correlates with the expression of  $\Delta$ EX2p73, or with K-ras oncogenic mutations in human colorectal cancer (Diaz *et al.*, 2008). The role of p73 in melanoma genesis

is poorly defined. A recent study shows that TA-p73 abrogates anchorage-independent growth through regulation of KCNK1, which is frequently lost in melanoma (Beitzinger *et al.*, 2008). N-ras oncogenic mutations are found in 20% of human melanomas and provide a proliferative advantage early in transformation (Chin, 2003). Analysis of GEO databases for possible correlation between PEDF expression and B-RAF or N-ras



mutations in melanoma yielded no significant correlation. Regulatory signals from the melanoma micro-environment may also influence PEDF expression. We found a nine-fold decrease in PEDF expression in primary melanocytes grown on collagen matrix preconditioned by a highly aggressive melanoma cell line, as compared with melanocytes grown on collagen without preconditioning (data not shown) (Seftor *et al.*, 2005). Additionally, hypoxia is a relevant trigger of the angiogenic switch and other epigenetic changes contributing to metastasis. PEDF is downregulated by hypoxia in retinoblastoma (Dawson *et al.*, 1999) and retinal pigment epithelial cells (Notari *et al.*, 2005). We also found that PEDF is downregulated by hypoxia in melanocytes and melanoma cell lines (data not shown).

In summary, our study shows that PEDF is expressed at high levels in the melanocyte, in which it contributes to restrict the growth, migration and invasion of melanocytes. PEDF expression is modulated in a complex fashion during malignant progression of human melanoma, in which it is likely reprogrammed to meet the current demand for proliferation, migration, invasion or angiogenesis.

## Materials and methods

### Cell culture

See Supplementary Methods for a detailed description of the cell lines used.

### Immunoblotting

Whole-cell lysates or CM were prepared and analyzed as described (Fernandez-Garcia *et al.*, 2005), and 15 µg whole-cell protein extracts or 1.5 µg CM were loaded per lane. Specific primary antibodies and dilutions are listed in Supplementary Table 1.

### ELISA

Secreted PEDF protein levels in CM were quantified using ELISAquant PEDF Sandwich ELISA Antigen Detection kit following the manufacturer's instructions (Bioproducts MD LLC, Middletown, MD, USA).

### Immunofluorescence and immunohistochemistry

Immunofluorescence and immunohistochemistry methods are included in Supplementary Methods.

### RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) and was retrotranscribed to cDNA using high-capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). See Supplementary Methods for the probes and oligonucleotides used. The quantitative PCR reaction was performed in an ABI Prism 7900 HT thermal cycler (Applied Biosystems) following the manufacturer's protocols. Relative mRNA levels were calculated using the comparative C<sub>T</sub> method as recommended by Applied Biosystems.

### Microarray data analysis

Previously published DNA microarray data sets comprising series of primary melanocytes or melanoma cell lines were downloaded from public database websites and analyzed as indicated in Supplementary Methods.

### RNA interference

PEDF knockdown was achieved using the lentiviral vector pGIPz containing the shRNA<sup>mir</sup> sequence VL2HS\_221662 from Open Biosystems (Huntsville, AL, USA). NS shRNA<sup>mir</sup> sequence cloned into pGIPz vector and with no homology to known mammalian genes was used as control (Open Biosystems).

### PEDF over-expression

For PEDF over-expression, we generated lentiviral constructs in prrl.CMV.EGFP.wpre.SIN vector encoding the full-length human PEDF cDNA as indicated in Supplementary Methods.

### Lentivirus production and transduction of target cell lines

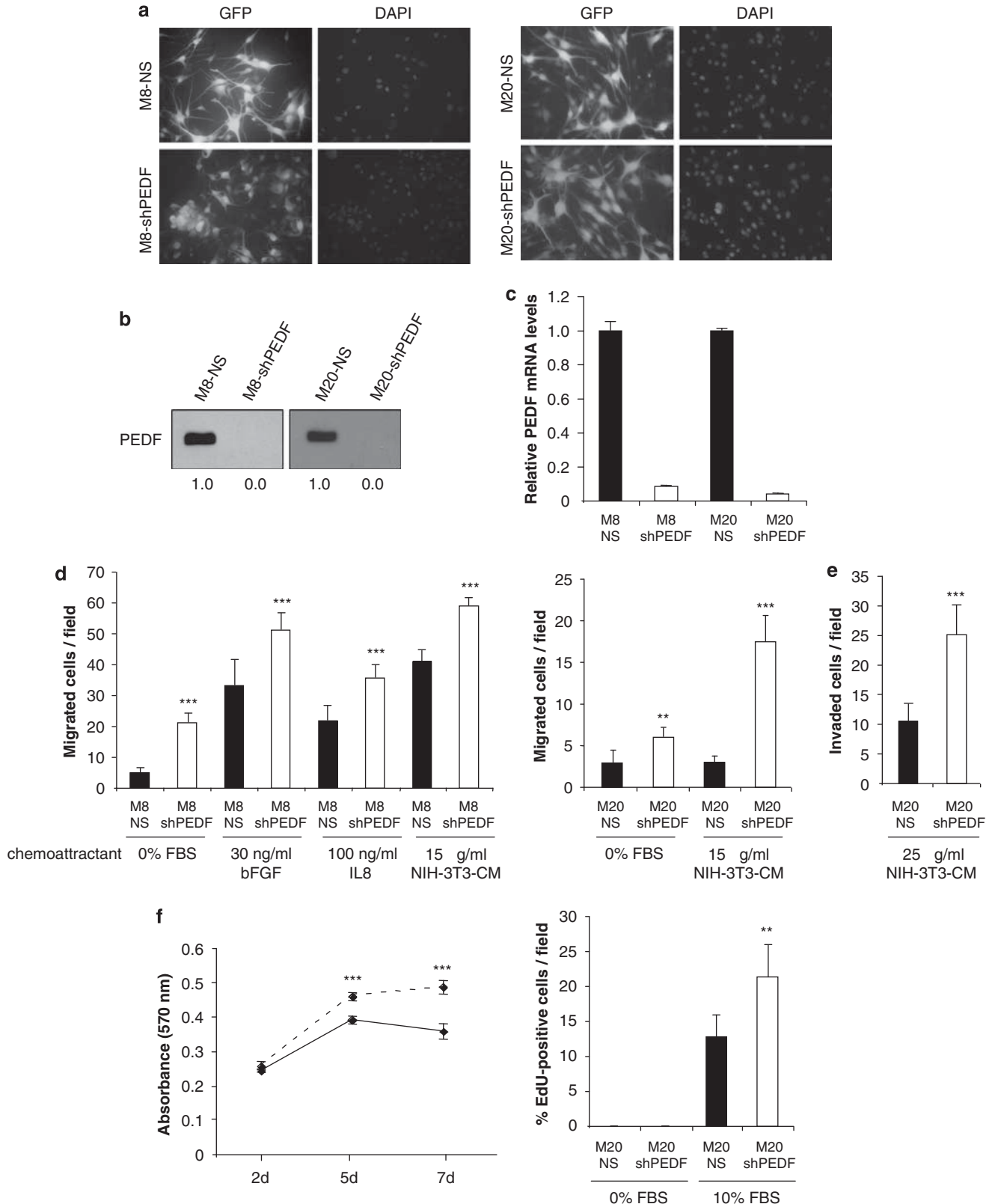
Lentiviruses were produced as described earlier (Punzon *et al.*, 2004). For transduction of target cells, lentiviruses at a multiplicity of infection of 10–60 were added to the culture medium in the presence of 8 µg/ml polybrene (Sigma, St Louis, MO, USA) for 8 h, typically resulting in more than 95% transduced (GFP-positive) cells. After 72 h, PEDF knockdown or over-expression was assessed. Then, PEDF-

**Figure 6** PEDF interference increases melanoma vasculogenic mimicry. **(a)** Transduction efficiency of C81-61 melanoma cell line after infection with non-silencing (NS) or shRNA<sup>mir</sup> to PEDF (shPEDF) lentivirus at a MOI of 40. Fluorescence images show more than 95% GFP-positive cells. Nuclei were visualized by DAPI staining (left panels). Immunoblotting analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from C81-61-NS and C81-61-shPEDF melanoma cell lines. Numbers below blot show densitometry values normalized to C81-61-NS expression (middle left panel). ELISA analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from C81-61-NS and C81-61-shPEDF melanoma cell lines. Bars represent average ± s.d. (middle right panel). Quantitative RT-PCR analysis of PEDF mRNA levels in C81-61-NS and C81-61-shPEDF melanoma cell lines. PEDF mRNA levels are shown relative to C81-61-NS after normalization to GAPDH. Bars represent average ± s.d. (right panel). **(b)** *In vitro* vasculogenic mimicry assay of C81-61, C81-61-NS and C81-61-shPEDF melanoma cell lines. Black arrows point to cord-like structures suggestive of vasculogenic mimicry in C81-61-shPEDF cells. **(c)** Formation of vasculogenic-like networks *in vivo* by C81-61-shPEDF melanoma cells. Hematoxylin/eosin (H&E) staining of lung sections from C81-61-NS- and C81-61-shPEDF-injected mice. Vessel-like structures and blood-filled lacunae (pointed by arrows) were detected in lungs from mice inoculated with C81-61-shPEDF cells (top). Immunofluorescence staining for GFP (red) and DAPI (blue) counterstaining are shown (bottom). **(d)** Transduction efficiency of C8161 melanoma cell line after infection with control (GFP) or PEDF-over-expressing (PEDF) lentivirus at a MOI of 10. Fluorescence images show more than 95% GFP-positive cells. Nuclei were visualized by DAPI staining (left panels). ELISA analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from C8161-GFP and C8161-PEDF melanoma cell lines. Bars represent average ± s.d. (middle panel). Quantitative RT-PCR analysis of PEDF mRNA levels in C8161-GFP and C8161-PEDF melanoma cell lines. PEDF mRNA levels are shown relative to C8161-GFP after normalization to GAPDH. Bars represent average ± s.d. (right panel). **(e)** Lung colonization assay of C8161-GFP and C8161-PEDF melanoma cell lines. Lung metastases were visualized by fluorescence imaging. Fluorescence images of the lungs (top, left) and quantification of surface metastases (top, right) are shown. Bars represent average ± s.d., and statistical significance was determined by Student's *t*-test (\**P* < 0.05). Bottom panels show H&E staining of lung sections. Vessel-like structures in the lungs of mice inoculated with C8161-GFP cells are indicated by arrows. **(f)** *In vitro* vasculogenic mimicry assay of C8161, C8161-GFP and C8161-PEDF melanoma cell lines. Cord-like structures in C8161 and C8161-GFP cell cultures are indicated by arrows.

over-expressing cell lines were enriched for GFP expression by fluorescence-activated cell sorting. For PEDF-knockdown cell lines, cells were selected with 0.25–1 µg/ml puromycin (Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA, USA) for 4 days.

#### Migration and invasion assays

Modified Boyden chambers with polycarbonate filters (6.5 mm diameter, 8.0 µm pore size) (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) were used to assess cell migration through 0.5%





gelatin-coated filters as described (Garcia *et al.*, 2004). To evaluate cell invasion, the filters were coated with 12 µg Matrigel (primary melanocytes) or growth factor reduced Matrigel (melanoma cell lines) (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) diluted in 100 µl serum-free medium, and air dried overnight. As chemoattractants, 10% fetal bovine serum; 30 ng/ml bFGF (Peprotech, London, UK); 100 ng/ml IL8 (Preprotech); or 10–25 µg/ml CM from NIH-3T3 cells were used. After incubation for the indicated time periods, non-migrated cells were wiped off using a cotton swab, and the filters were stained with Diff Quik (Dade Behring, Newark, DE, USA). Migrated cells were counted at 10 areas of maximum migration under a light microscope at  $\times 40$  magnification. Average  $\pm$  standard deviation (s.d.) values shown are representative of at least three independent experiments.

#### Proliferation assays

Melanocyte S-phase entry was analyzed by the incorporation of 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) using the Click-iT EdU Imaging kit (Invitrogen, Paisley, UK) as indicated by the manufacturer. EdU-positive cells were counted in six different fields using a TCS SP5 DMI6000 spectral confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Melanocyte viability was also measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma), following the manufacturer's instructions. Results using EdU and MTT were confirmed in two independent primary cultures, and a representative experiment is shown.

#### In vitro VM assay

Tissue culture plates were coated with collagen I (BD Discovery Labware, Bedford, MA, USA), soaked in ethanol and rinsed in PBS;  $5 \times 10^5$  cells were seeded on the matrix in 24-well plates in regular growth media and left to grow for up to 8 days. Images were taken on day 6.

#### Colony formation assay

A total of  $2.5 \times 10^4$  cells were resuspended in 0.35% Noble agar (BD Biosciences) in RPMI with 10% fetal bovine serum and seeded on 0.5% Noble agar in the same medium in 6-well plates. Phase-contrast micrographs were taken after 11 days of culture using a magnifying glass at  $\times 0.7$ .

#### Lung colonization assay

NOD/SCID mice (Harlan Laboratories, Madison, WI, USA; 5 mice per group) were injected through the tail vein with melanoma cells suspended in 100 µl PBS ( $1 \times 10^6$  cells for SBcl2-NS, SBcl2-shPEDF, C81-61-NS and C81-61-shPEDF cell lines;  $1 \times 10^5$  cells for C8161-GFP or C8161-PEDF cell

lines). At the end point (92 days for SBcl2-NS- and SBcl2-shPEDF-injected mice; 21 days for C81-61-NS- and C81-61-shPEDF-injected mice; and 28 days for C8161-GFP- and C8161-PEDF-injected mice) the mice were killed, the lungs removed and photographed using Olympus OV100 Small Animal Imaging System (Olympus Corp., Tokyo, Japan), and surface metastases were counted manually. The lungs were formalin fixed, paraffin embedded and sectioned for further analysis. Hematoxylin/eosin staining was performed at Northwestern University Pathology Core.

#### Spontaneous metastasis assay

Melanoma cells were injected subcutaneously into the right flank of nude mice (Harlan Laboratories) ( $1 \times 10^6$  cells/flank for C8161-derived cell lines and  $2 \times 10^6$  cells/flank for C81-61-derived cell lines; 10 mice/cell line) and the tumors were allowed to grow for 4 weeks (C8161-derived cell lines) or 9 weeks (C81-61-derived cell lines). The animals were killed, the lungs and livers excised, rinsed in PBS and fluorescence images were taken using Olympus OV100 Small Animal Imaging System (Olympus Corp.). The number of surface lesions was determined on digital images using MetaMorph software package (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA).

#### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Instat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *P*-values  $\leq 0.05$  were considered as significant.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

We acknowledge with gratitude all researchers that contributed with cell lines: M Herlyn, PF Peñas, F Vidal-Vanaclocha, GN Van Muijen, AM Valverde, M Garcia and M del Rio. We also thank P Fernández for her technical assistance in lentivirus production. Supported by grants: Ministerio de Educación y Ciencia grant SAF2007-62292 (BJ), Comunidad de Madrid SAL-0311-2006 (BJ), NIH grant RO1 HL68033 (OV), NIH merit grant CA59702 (MJCH). JL Orgaz has been supported by a Ministerio de Educación y Ciencia fellowship, O Ladhani by an NIH/NCI training grant T32CA009560 and A Fernández-Barral by a Consejo Superior de Investigaciones Científicas fellowship.

**Figure 7** PEDF interference augments migration, invasion and proliferation of the primary melanocytes. (a) Transduction efficiency of M8 (left panels) and M20 (right panels) primary melanocytes after infection with non-silencing (NS) or shRNA<sup>mir</sup> to PEDF (shPEDF) lentivirus at a MOI of 40. Fluorescence images show more than 95% GFP-positive cells. Nuclei were visualized by DAPI staining. (b) Immunoblotting analysis of secreted PEDF protein levels in 48 h CM from M8-NS, M8-shPEDF (left), M20-NS and M20-shPEDF (right) melanocytes. Numbers below blots show densitometry values normalized to NS cells expression. (c) Quantitative RT-PCR analysis of PEDF mRNA levels in M8-NS, M8-shPEDF, M20-NS and M20-shPEDF melanocytes. PEDF mRNA levels are shown relative to NS cells after normalization to 18S rRNA. Bars represent average  $\pm$  s.d. (d) Migration assays of M8-NS and M8-shPEDF (left) and M20-NS and M20-shPEDF (right) melanocytes toward 30 ng/ml bFGF, 100 ng/ml IL8 or 15 µg/ml CM from NIH-3T3 cells for 22 h. Statistical significance was determined by ANOVA using Tukey–Kramer post-test (\*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001). (e) Invasion assay of M20-NS and M20-shPEDF melanocytes toward 25 µg/ml CM from NIH-3T3 cells for 24 h. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (\*\*\**P* < 0.001). (f) Proliferation assays. Proliferation curves of M20-NS (solid line) and M20-shPEDF (dashed line) melanocytes growing in the presence of serum. MTT assay was performed at the indicated time points (left panel). Right panel shows 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) incorporation of M20-NS and M20-shPEDF melanocytes. Cells were serum-starved for 24 h and then were allowed to grow in the presence of 20 µM EdU in serum-free medium or 10% FBS-containing medium for another 24 h. Bars represent average  $\pm$  s.d. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (\*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001).

## References

- Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, Cornwell M, Arensman RM, Crawford SE. (2003). Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg* **38**: 336–342.
- Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP. (1999). Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* **274**: 31605–31612.
- Aymerich MS, Alberdi EM, Martinez A, Becerra SP. (2001). Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 3287–3293.
- Becerra SP. (1997). Structure-function studies on PEDF A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol* **425**: 223–237.
- Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H et al. (2008). p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *EMBO J* **27**: 792–803.
- Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, Moss BH, Aymerich MS, Kuncel RW. (2002). Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* **22**: 9378–9386.
- Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW. (1999). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 719–728.
- Bouck N. (1990). Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* **2**: 179–185.
- Bouck N. (2002). PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* **8**: 330–334.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS et al. (2006). Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* **20**: 3426–3439.
- Chin L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* **3**: 559–570.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W et al. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**: 245–248.
- Diaz R, Pena C, Silva J, Lorenzo Y, Garcia V, Garcia JM et al. (2008). p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b down-regulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer* **123**: 1060–1067.
- Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP et al. (2003). Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* **9**: 774–780.
- Ek ET, Dass CR, Choong PF. (2006a). PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med* **12**: 497–502.
- Ek ET, Dass CR, Choong PF. (2006b). Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* **5**: 1641–1646.
- Fernandez-Garcia NI, Palmer HG, Garcia M, Gonzalez-Martin A, del Rio M, Barettino D et al. (2005). 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene* **24**: 6533–6544.
- Fernandez-Garcia NI, Volpert OV, Jimenez B. (2007). Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* **85**: 15–22.
- Filleur S, Volz K, Nelius T, Mirochnik Y, Huang H, Zaichuk TA et al. (2005). Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res* **65**: 5144–5152.
- Garcia M, Fernandez-Garcia NI, Rivas V, Carretero M, Escamez MJ, Gonzalez-Martin A et al. (2004). Inhibition of xenografted human melanoma growth and prevention of metastasis development by dual antiangiogenic/antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Res* **64**: 5632–5642.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**: 851–857.
- Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, Liu WW et al. (2003). Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol* **56**: 277–282.
- Halin S, Wikstrom P, Rudolfsson SH, Stattin P, Doll JA, Crawford SE et al. (2004). Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. *Cancer Res* **64**: 5664–5671.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* **3**: 411–421.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM. (2007). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* **7**: 246–255.
- Ho TC, Chen SL, Yang YC, Liao CL, Cheng HC, Tsao YP. (2007). PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR gamma signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res* **76**: 213–223.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L et al. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **68**: 650–656.
- Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R et al. (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* **19**: 290–302.
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. (2001a). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**: 3819–3825.
- Li G, Schaidt H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M. (2001b). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* **20**: 8125–8135.
- Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, Eguchi K. (2004). Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **40**: 252–259.
- Miller AJ, Mihm Jr MC. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* **355**: 51–65.
- Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C et al. (2006). Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* **281**: 38022–38037.
- Notari L, Miller A, Martinez A, Amaral J, Ju M, Robinson G et al. (2005). Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 2736–2747.
- Punzon I, Criado LM, Serrano A, Serrano F, Bernad A. (2004). Highly efficient lentiviral-mediated human cytokine transgenesis on the NOD/scid background. *Blood* **103**: 580–582.
- Quan GM, Ojaimi J, Li Y, Kartsogiannis V, Zhou H, Choong PF. (2005). Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. *Calcif Tissue Int* **76**: 146–153.
- Sasaki Y, Naishiro Y, Oshima Y, Imai K, Nakamura Y, Tokino T. (2005). Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* **24**: 5131–5136.
- Sato S, Yamamoto H. (2001). Development of pigment cells in the brain of ascidian tadpole larvae: insights into the origins of vertebrate pigment cells. *Pigment Cell Res* **14**: 428–436.
- Sawant S, Aparicio S, Tink AR, Lara N, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. (2004). Regulation of factors controlling angiogenesis in liver development: a role for PEDF in the formation and maintenance of normal vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* **325**: 408–413.
- Seftor EA, Brown KM, Chin L, Kirschmann DA, Wheaton WW, Protopopov A et al. (2005). Epigenetic transdifferentiation of

- normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* **65**: 10164–10169.
- Seigel GM, Tombran-Tink J, Becerra SP, Chader GJ, Dilorito Jr DA, del Cerro C *et al.* (1994). Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. *Growth Factors* **10**: 289–297.
- Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. (1993). Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1526–1530.
- Tombran-Tink J, Barnstable CJ. (2003). PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* **4**: 628–636.
- Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H *et al.* (2004). Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **64**: 3533–3537.
- van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA *et al.* (2004). Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* **96**: 1473–1477.
- Yabe T, Wilson D, Schwartz JP. (2001). NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* **276**: 43313–43319.
- Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Abe R, Shimizu T, Yoshimura A *et al.* (2004). Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol* **37**: 497–506.
- Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert OV. (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* **199**: 1513–1522.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

# **“Pigment epithelium-derived factor: an angiostatic factor with a broader function in melanoma”**

A. Fernández-Barral<sup>1</sup>, J.L. Orgaz<sup>1,2</sup> and B. Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM-Departamento de Bioquímica UAM, Madrid, Spain*

<sup>2</sup>*Present address: Randall Division of Cell & Molecular Biophysics, King's College London, London, SE1 1UL, U.K.*

## **1. Introduction**

Metastatic spread is achieved through changes in the tissue microenvironment driven by tumor cells that allow the formation of various dissemination routes using a variety of mechanisms; such as angiogenesis and vasculogenesis (hematogeneous routes), lymphangiogenesis (lymphatic routes), and in some particular cases like melanoma, vasculogenic mimicry (vasculogenic channels lined by melanoma cells) (Carmeliet, 2005; Hendrix *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006; Tammela and Alitalo, 2010). Building of dissemination routes has to be coordinated with the acquisition of new capabilities by tumor cells that enable them to locally invade, intravasate into dissemination channels, survive in the circulation, extravasate, and ultimately adapt to a foreign territory. All this complex cascade of events is orchestrated by multiple cell types and diverse families of factors and signaling circuits controlling intracellular as well as intercellular key communication events (Nguyen *et al.*, 2009b).

Interestingly, a particular subset of extracellular factors have the dual capacity to simultaneously impinge on the formation of the dissemination routes and to modulate many of the properties that the tumor cells themselves have to acquire in order to fulfill all steps required to successfully colonize a foreign territory starting from a primary lesion in a drastically different environment. This chapter focuses on an angiostatic factor, pigment epithelium derived factor (PEDF), with a broader function in melanoma that allows it to dually impinge on destroying some of the more relevant dissemination routes and on counteracting key tumor cell properties that enable the metastatic spread of melanoma cells. Understanding of the molecular and cellular mechanisms controlling melanoma progression has become an active field of research over the last five years unveiling a complex intertwined relationship between melanoma cells and the diverse cell types present in the tumor microenvironment, as well as a number of key molecular mediators (Shackleton and Quintana, 2010; Villanueva and Herlyn, 2008). Plasticity of melanoma cells allows them for appropriate reprogramming underlying the decision making process that arbitrates proliferation and migration as mutually exclusive cellular responses that need to alternate in the course of tumor progression (Hendrix *et al.*, 2007; Hoek *et al.*, 2008). We have recently

interrogated the role of PEDF, an angiostatic factor produced at high levels by skin melanocytes, in controlling the switch between proliferative and invasive states of melanoma cells and its contribution to restrict the metastatic cascade. Our results demonstrate that loss of PEDF expression enables melanoma cells to acquire an invasive state and therefore its reprogramming is critical for the malignant progression of melanoma (Orgaz *et al.*, 2009).

## **2. Angiogenesis and melanoma. The role of endogenous inhibitors of angiogenesis**

As in every tissue of our body angiogenesis is finely tuned in the skin by the balance of endogenous angiogenic growth factors and endogenous angiogenic inhibitors (Jimenez and Volpert, 2001). Although the pattern of skin vascularization established during development renders the skin a mildly hypoxic microenvironment ( $pO_2$  in the dermal/epidermal junctions ranging from 0.5% to 10%) (Bedogni and Powell, 2009), a number of physiological processes like skin wound healing and cycles of hair follicle growth, and an increasingly recognized number of cutaneous pathologies (Laquer *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2009a) require new vessel formation to respectively achieve proper tissue homeostasis in physiological contexts or to chronically activate angiogenesis in the pathological settings.

Angiogenesis is a hallmark of cancer and it is of significant relevance for the life threatening stage of the disease, the metastatic spread (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). Angiogenesis is a pivotal process required to effectively deliver oxygen and nutrients and to eliminate waste products in lesions beyond 1-2mm of diameter (Folkman, 2006). Unlimited growth of primary lesions, activation of dormant micrometastases (Goss and Chambers, 2010), as well as the growth of micrometastases to macrometastases (Gao *et al.*, 2008), all require neovascularization. The so called tumor angiogenic switch refers to the mechanisms responsible for shifting the balance towards predominance of angiogenic growth factors accompanied by loss of angiogenesis inhibitors. Activation of tumor angiogenic switch triggers the transition from the avascular to the vascular phase of tumor growth, which is characterized by uncontrolled, excessive and aberrant neovascularization. The vascular phase sustains unlimited neoplastic growth and provides diverse vascular routes for the metastatic dissemination of the primary lesion. There is significant evidence supporting that cancer metastasis can be determined by the angiogenic potential of the primary tumor cells (Kerbel, 2008). Also, preclinical studies using mouse models, as well as clinical studies using biopsies have shown that there is a direct association between incidence of metastases and the microvascular density in vascular hot spots in the tumor periphery (Nico *et al.*, 2008).

Based on the relevance of tumor neovascularization for the progression of the disease and patient outcome, there has been over the last four decades an explosion of the cellular and molecular knowledge of the mechanisms and key molecules involved in the creation of the diverse types of vessels networks that allow for tumor cell dissemination. All this knowledge also led to a rapid and fruitful translation to the clinic of the first generation of antiangiogenic drugs (Ellis and Hicklin, 2008; Ferrara and Kerbel, 2005; Jain, 2008; Jubb *et al.*, 2006; Loges *et al.*, 2009; Orgaz *et al.*, 2008) which have been used up to now in the context of advanced disease and as a general rule in combination with a wide range of



chemotherapeutic agents or radiation therapy. Also, the general principle of antiangiogenic therapy of cancer in the clinic has been almost exclusively based on the use of single antiangiogenic agents or drugs. Although most of these studies have obtained reasonably encouraging results, further evaluation of more complex therapeutic regimens targeting simultaneously multiple angiogenesis pathways should be warranted in patients with advanced melanoma and other cancers; or when required to overcome resistance to first line antiangiogenic drugs (Bergers and Hanahan, 2008). Notwithstanding, the broad armory of identified antiangiogenic drugs should allow designing optimum combinations of antiangiogenic drugs that hopefully will be: (i) more efficient and of greater benefit for each particular type of cancer, (ii) used as second line antiangiogenic therapies in cases of resistance to first line antiangiogenic drugs, or (iii) useful to suitably design the most likely effective strategy considering the characteristics of each patient's type of tumor vascular bed.

The mildly hypoxic microenvironment of the skin significantly contributes to melanocyte transformation, as the result of hypoxia effects promoting both proliferation and survival. Thus, hypoxia has emerged as a relevant tumor-promoting environmental factor in melanoma (Bedogni and Powell, 2009). Additionally, hypoxia is one of the main regulators of angiogenic growth factors and angiogenic inhibitors, which contributes to tilt the balance towards inducers of angiogenesis and to impose the loss of relevant angiostatic factors during tumor progression (Rey and Semenza, 2010).

Studies with human melanoma xenograft models in nude mice as well as with human melanoma biopsies demonstrated that melanoma cells are an important source of angiogenic growth factors like vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), placenta growth factor (PlGF), transforming growth factors- $\alpha$  and  $\beta$  (TGF- $\alpha$  and  $\beta$ ), platelet derived growth factor-B (PDGF-B) and interleukin-8 (IL-8), among others (Basu *et al.*, 2009; Mahabeleshwar and Byzova, 2007). A number of studies have correlated melanoma neovascularization with poor patient prognosis, overall survival, ulceration and increase rate of relapse; as it is the case in many other types of cancers (Ria *et al.*, 2010). However, production of angiogenesis inhibitors by melanoma cells and their regulation in the course of melanoma progression has remained poorly explored.

We have recently focused on the study of the angiostatic factor pigment epithelium derived factor (PEDF) in human melanocytes and melanoma progression (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2004; Orgaz *et al.*, 2009). PEDF was originally described as the most potent angiostatic factor in the eye that plays a relevant role in ensuring the correct pattern of vascularization of diverse eye compartments (Bouck, 2002). PEDF is produced at high levels by retinal pigment epithelial (RPE) cells, and it counteracts a number of potent angiogenic growth factors in the retina like VEGF, insulin growth factor-1 (IGF-1), bFGF, etc; ensuring the right balance of angiogenic regulators that leads to an optimum physiological pattern of blood vessels for correct retinal function. Importantly, avascular eye compartments like the vitreous and cornea are rich in PEDF. To further support the relevance of PEDF in the eye, a number of eye pathologies like diabetic retinopathy and eye related macular degeneration are associated with loss of PEDF expression and therefore predominance of the action of angiogenic growth factors, leading to excessive and aberrant vascularization patterns associated with loss of vision (Tombran-Tink, 2010).

We have recently shown that melanocytes are also among the cell types in our body that produce and secrete the highest levels of PEDF (Orgaz *et al.*, 2009), which are comparable to the levels produced by RPE cells, neural cells or retinoblastoma cells. However, endothelial cells, one of the main targets of PEDF's action, produce very low levels of this angiostatic factor and therefore rely on other cell types to bring PEDF to many scenarios where proper tissue homeostasis requires halting the angiogenic cascade to render the vasculature to a quiescent state. If PEDF is highly produced by melanocytes the following questions arise: (i) is there an autocrine role of PEDF on pigment cells? It has been recently described that PEDF is stored in melanosomes, although its putative role in the regulation of pigment production and secretion remains to be explored (Chi *et al.*, 2006). Furthermore, PEDF directly modulates the proliferative and migratory capability of normal melanocytes (Orgaz *et al.*, 2009), (ii) is PEDF expression regulated during melanoma progression?, and which are the functional consequences of its modulation? Our insights about these questions will be addressed in the following section.

Primary melanoma biopsies are characterized by high PEDF expression in the vast majority of human biopsies analyzed, although a significant degree of heterogeneity exists (Orgaz *et al.*, 2009; and unpublished data). Conversely, PEDF expression is lost in cutaneous metastases of human melanoma (Orgaz *et al.*, 2009).

When is angiogenesis switched on during melanoma progression and its relevance for the metastatic spread of human melanoma is still a matter of certain debate (Basu *et al.*, 2009; Helfrich *et al.*, 2010). Lack of consensus most probably reflects difficulty on adequately defining staging and progression of melanoma, together with limitations of currently available models to explain how melanoma evolves and malignizes (see Section 3.1). It seems plausible that acquisition of angiogenic potential and increase in microvascular density occur gradually as melanoma lesions progress from the radial growth phase (RGP) to the vertical growth phase (VGP) and to the metastatic phase (M). In our studies we found that the most dramatic regulation of PEDF levels corresponds to the transition from primary melanoma to cutaneous metastases of melanoma (described in more detail in Section 3.3). Also most likely melanomas progressively develop a more profuse network of blood vessels from RGP to VGP, but due to the extreme heterogeneity of human melanoma biopsies we were unable to find important differences on the level of PEDF when comparing RGP to VGF biopsies, although there was a tendency to a decrease from RGP to VGP (unpublished data).

We have directly explored by means of global gene expression analysis using microarrays the consequences of PEDF overexpression on the angiogenic potential of human melanoma cells. Importantly, exogenous PEDF overexpression abrogates the ability of aggressive melanoma cells to produce potent angiogenic growth factors like VEGF or IL-8, tilting the balance towards inhibition of melanoma angiogenesis (Orgaz *et al.*, 2011). Given the role of VEGF and IL-8 as highly potent angiogenic growth factors in melanoma, together with their role in directly promoting melanoma cell migration and invasion; the abrogation of their production by melanoma cells upon PEDF's action is of special relevance. Additionally, both VEGF and IL-8 increase vascular permeability and therefore, by eliminating these angiogenic growth factors PEDF normalizes to a certain extent tumor vascular leakiness and thereby impedes melanoma intravasation/extravasation. Finally, a number of extracellular matrix proteins (like collagen IV A2 (COL4A2) and fibronectin 1 (FN1)), matrix enzymes

and matrix metalloproteinases (such as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), a disintegrin and metalloproteinase domain (ADAMs), a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTs)) or serine (or cysteine) proteinase inhibitor (SERPINs) and integrins (like integrin  $\beta$ 3) relevant in different steps of the angiogenic cascade were modulated by PEDF, with a trend corresponding to halting the angiogenic process (Orgaz *et al.*, 2011).

Finally, as melanoma cells become more aggressive they acquire the ability to mimic molecularly and functionally the endothelial cells. This specific reprogramming, characteristic of highly aggressive melanoma cells, is called vasculogenic mimicry, and endows them with the ability to form vascular channels lined by melanoma cells; which represent a unique escape route for the spread of melanoma (Hess *et al.*, 2007). We found that PEDF is able to impede the formation of melanoma vasculogenic channels in the lungs of nude mice in colonization assays of human melanoma cell lines (Orgaz *et al.*, 2009); which adds another mechanism of antimetastatic action for this multifunctional factor. The molecular bases by which PEDF abrogates melanoma vasculogenic mimicry are still unknown and would be extremely interesting to explore in view of the relevance of this mechanism in the context of melanoma dissemination.

Another relevant aspect of the tumor vasculature that distinguishes it from normal vasculature is the degree of vessel maturation (Baluk *et al.*, 2005; Jain, 2003). Over the last decades it was demonstrated that the efficacy of antiangiogenic strategies in solid tumors is inversely correlated to the degree of maturation of the tumor vascular bed (Helfrich and Schadendorf, 2011; Jimenez and Volpert, 2001). This was the case not only for strategies based on interference with angiogenic growth factors and their receptors, but also for angiostatic factors like PEDF. We demonstrated that PEDF only induces vessel regression of immature vessels poorly covered by pericytes, while those tumor vessels that are covered with pericytes over the course of time of tumor establishment remain invulnerable to PEDF's angiostatic action (Garcia *et al.*, 2004). This important mechanistic observation opened up the following therapeutic windows: (i) use of antiangiogenic strategies at very early stages of tumor progression, when presumably a larger proportion of the vessels are still immature; (ii) use of antiangiogenic strategies in tumor types in which the majority of vessels remain immature; and (iii) design combination therapies in which antiangiogenic strategies directed to endothelial cells are concomitantly used with drugs directed to pericytes aimed to destabilize the tumor vasculature by depriving it of the interactions with pericytes, and therefore rendering it immature. Notwithstanding the limitation on the angiostatic action of PEDF, which is restricted to immature vessels, all direct PEDF's effects on melanoma cells contribute to halt melanoma metastases, and strongly support the development of novel therapeutic strategies based on knowledge of the diverse actions of this biological modifier of melanoma.

The mechanism by which PEDF induces immature blood vessel regression has been studied in detail over the last years by us and others. A common characteristic in the mechanism of action of PEDF and all the endogenous inhibitors of angiogenesis so far described (thrombospondin-1, angiostatin, endostatin, canstatin, tumstatin, etc) is that they are capable of inducing apoptosis in endothelial cells present in immature, remodeling vessels, thus causing selective regression of the expanding aberrant tumor vasculature without affecting normal vessels (Jimenez and Volpert, 2001; Volpert, 2000). Angiogenic growth factors like

VEGF act like essential survival factors in this pathological scenario, but the action of endogenous inhibitors of angiogenesis is dominant over that of inducers. PEDF induces apoptosis in remodeling endothelial cells by inducing Fas ligand (CD95L) expression on the surface of activated endothelial cells via nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFkB) (Aurora *et al.*, 2010; Volpert *et al.*, 2002), which initiates an extrinsic cell death cascade. In concert, PEDF hampers endothelial cells survival by reducing the expression of pro-survival factor caspase-8 FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) through the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) (Zaichuk *et al.*, 2004). Besides, we have also demonstrated that under stress conditions like serum withdrawal or lack of extracellular matrix attachment, PEDF has a certain capacity to induce melanoma cell apoptosis although with a weaker potency than in endothelial cells (Garcia *et al.*, 2004). Reduced survival of melanoma cells caused by the absence of attachment in the presence of high PEDF circulating levels has important consequences for the outcome of tumor cells in transit to the metastatic site.

There are still a number PEDF's putative actions on the various tumor vascularization mechanisms described so far that remain to be explored and that are of critical importance: (i) does PEDF affect haematopoietic precursor cells recruitment?, (ii) does PEDF block vasculogenesis (formation of new vessels from endothelial progenitor cells)?, (iii) does PEDF induce lymphatic vessels regression? There is no report linking PEDF to vasculogenesis, but it has recently been described that PEDF decreases lymph node metastasis of prostate cancer, while paradoxically increases extratumoral lymphangiogenesis by unknown mechanisms (Halin *et al.*, 2010).

In the context of spread of the disease an attractive benefit of antiangiogenic strategies is their potential to keep micrometastases in a dormant state (Gao *et al.*, 2008; Goss and Chambers, 2010). Thrombospondin-1 has been proven to be effective in preventing the growth of dormant pulmonary micrometastases in human melanoma xenografts after surgical resection or curative radiation of the primary tumor (Rofstad *et al.*, 2004; Rofstad *et al.*, 2003). PEDF's capability to maintain dormant micrometastases in check, preventing their growth to macrometastases remains to be evaluated, but it could be of relevant therapeutic interest.

Moreover, it has been shown that PEDF is also produced by a wide variety of epithelial cell types in different tissues and its role in controlling primary tumor growth, angiogenesis and metastatic spread has been explored in a wide range of tumors using diverse mouse models, and analysis of human biopsies. Levels of angiostatic PEDF decrease during the progression of a number of cancers, such as hepatocellular carcinoma (Matsumoto *et al.*, 2004), prostate cancer (Halin *et al.*, 2004; Qingyi *et al.*, 2009), breast adenocarcinoma (Cai *et al.*, 2006), glioblastoma (Guan *et al.*, 2003) and Wilm's tumors (Abramson *et al.*, 2003). A number of recent excellent reviews cover the antitumor and antimetastatic action of PEDF on several tumor types (Broadhead *et al.*, 2009; Fernandez-Garcia *et al.*, 2007; Hoshina *et al.*, 2010).

### **3. Halting melanoma progression. The role of pigment epithelium-derived factor**

#### **3.1 Cutaneous melanoma. Current models of melanoma progression**

Melanoma cells arise from melanocytes, normal cells specialized in the production of pigment melanin, which reside in the basal layer of the epidermis, among other locations, and whose homeostasis is tightly controlled by epidermal keratinocytes (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). The classical model of melanoma progression describes melanoma development as a series of histopathological steps regarding the thickness and the grade of invasion of the lesion (Clark, 1991). Nevi are relatively benign lesions that rarely progress to melanoma, in part because most of melanocytes in nevocytic lesions are in a state of senescence-associated growth arrest (Michaloglou *et al.*, 2005). Radial growth phase, RGP, melanomas have high proliferative potential but null or very low invasive ability, being confined to the epidermis (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). In contrast, vertical growth phase VGP, melanomas are competent for metastasis, fully invade the upper part of the epidermis as well as the dermis and the subcutaneous tissue, being able to reach blood or lymph circulation and eventually colonize and develop secondary tumors at distant organs (Chin *et al.*, 2006; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). This model is in agreement with the tumor clonal evolution model (Nowell, 1976), which hypothesizes that cancer evolves from a poorly to a highly metastatic phase through accumulation of molecular alterations (mutations and/or epigenetic changes) that enhance proliferative and invasive potential of tumor cells, and that would promote lineal progression from RGP to VGP to metastasis (Miller and Mihm, 2006).

Even though the classification of melanomas according to the thickness of the lesion is one of the most widely used methods for the diagnosis and prognosis of melanoma (Fecher *et al.*, 2007), frequently there are lesions whose thickness does not correlate with their actual aggressiveness and metastatic outcome (Lomuto *et al.*, 2004; Slingluff *et al.*, 1988). Besides, this model does not offer either convincing explanations for the heterogeneity found in metastatic melanoma cells, nor for the persistent failure of anti-melanoma therapies. Consequently, in the last decade researchers have aimed to establish a molecular classification of melanoma utilizing gene expression profiling tools (Fecher *et al.*, 2007; Hoek, 2007; Hoek, 2009). A number of studies have been able to classify collections of melanoma cell lines or biopsies into groups differing in their aggressiveness and metastatic potential, confirming the large heterogeneity of melanoma and the importance of the microenvironment in determining gene expression programs of melanoma cells and progression to metastasis (Bittner *et al.*, 2000; Haqq *et al.*, 2005; Hoek, 2007; Pavey *et al.*, 2004).

One of these studies, by means of genome wide gene expression analysis and functional assays, described that most melanoma cell lines could be categorized according to their gene expression profile into two extreme phenotypes, proliferative or invasive (Hoek *et al.*, 2006). The proliferative gene signature encompasses a number of melanocytic lineage genes such as microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and some of its targets, while the invasive phenotype signature is defined by suppressed expression of proliferative genes in favor of others related to the modification of the tumor microenvironment (Hoek *et al.*, 2006). Based on this and other studies a new melanoma progression model was proposed,

which takes into account the heterogeneous nature of melanoma and the key role of the tumor microenvironment (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008; Hoek, 2009; Hoek *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2006). This new model, referred to as phenotype switching, considers metastatic potential split into two mutually exclusive and reversible states, proliferative and invasive, and hypothesizes that melanoma progression is driven by the reversible switching between these two phenotypes (Hoek, 2009). A primary lesion would be initially composed of proliferative phenotype cells. Signals from the microenvironment, such as hypoxia or inflammation, would make some cells switch their gene signature to become invasive, which would allow them to escape from the primary tumor and eventually reach and colonize a foreign distant organ. There, signals from the new environment would reprogram cells back to the proliferative signature, ultimately developing metastases (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2008).

The phenotype switching model also relies on human melanoma high plasticity and ability to be reprogrammed. As mentioned before, an example of the high plasticity of melanoma cells is vasculogenic mimicry (Seftor *et al.*, 2002). Some aggressive melanoma cells have been found to express molecular markers typical of other cell types, such as endothelial cells, which presumably allow melanoma cells to form vasculogenic networks that mimic blood vessels, and that could serve as an alternative route of escape for melanoma cells. This phenomenon has also been reported to occur *in vivo* in aggressive human melanoma samples, and correlates with poor outcome (Folberg *et al.*, 2000; Hendrix *et al.*, 2003; Maniotis *et al.*, 1999). Furthermore, poorly aggressive melanoma cells can be reprogrammed to highly aggressive and invasive by exposing them to matrices preconditioned by more aggressive melanoma cells, highlighting the importance of the tumor microenvironment in driving melanoma progression (Postovit *et al.*, 2006; Seftor *et al.*, 2006).

### 3.2 Melanoma invasion

Primary melanoma patients can be usually cured by surgical removal of the tumor when detected early, but most of the times melanoma rapidly metastasizes with a poor outcome (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Therefore it is essential to understand the mechanisms by which melanoma cells escape from the primary tumor and spread and invade other organs, in order to develop improved therapies that increase patient survival rates. Following there is a brief summary detailing some key molecules involved in melanoma migration/invasion and metastasis; interested readers are suggested to read topic reviews elsewhere (Gaggioli and Sahai, 2007; Uong and Zon, 2010).

MITF plays a pivotal role in melanocyte and melanoma biology, as it is involved not only in the control of migration and invasion, but also in proliferation, survival, and differentiation of melanocytic cells (Levy *et al.*, 2006). The fine tuning of MITF activity enables melanoma cells to switch between a proliferative (high MITF) or invasive (low MITF) state, while very high levels promote differentiation and complete absence of MITF is incompatible with survival (Carreira *et al.*, 2006; Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Additionally, a number of growth factors and cytokines are upregulated as melanoma becomes more invasive, such as hepatocyte growth factor (HGF), TGF- $\beta$ , IL-8, Nodal and several members of fibroblast growth factor (FGF) family (al-Alousi *et al.*, 1996; Albino *et al.*, 1991; Topczewska *et al.*, 2006). In addition to the autocrine effect on melanoma cells

themselves upregulating cell motility genes, these factors are thought to have also paracrine pro-invasive effects, since they can signal to other cell types of the microenvironment, such as fibroblasts, to produce more pro-invasive molecules, like tenascin C and HGF (De Wever *et al.*, 2004). On the other hand, HGF receptor c-Met has also been shown to have pro-invasive effects in melanocytes and melanoma cells (McGill *et al.*, 2006).

Melanoma inhibitory activity (MIA) protein is highly expressed in malignant melanomas but not in melanocytes (Bossert, 2005). Several studies have shown that MIA enhances melanocyte and melanoma migration and invasion (Tatzel *et al.*, 2005), and additionally have suggested a central role for MIA in early melanoma development by regulating important melanoma-related pathways (Bossert, 2005).

The Snail family transcription factors Snail and Slug have also increased activity in melanoma, since they downregulate the expression of keratinocyte-interacting surface molecules, such as E-cadherin and occluding, while upregulate N-cadherin, favoring interaction with stromal cells and not keratinocytes (Gaggioli and Sahai, 2007; Kajita *et al.*, 2004). Furthermore, Snail co-ordinately upregulates the expression of cell motility genes including matrix metalloproteinase (MMP)- 2, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and RhoA (Kuphal *et al.*, 2005).

Recently several studies have highlighted that melanoma cells also display a high plasticity regarding their cell motility. Melanoma cells can migrate and invade with different modes of movement that presumably allow them to adapt to varying microenvironments (Sahai and Marshall, 2003; Sanz-Moreno *et al.*, 2008). The main switches of these melanoma cell motility programs are Rho-GTPases family members Rac and Rho (Sanz-Moreno *et al.*, 2008), which are overexpressed in cancer (Sahai, 2005). Rac promotes a more elongated shape that requires matrix metalloproteinases in order to invade, while RhoA favors a rounded morphology and a movement less dependent on proteases (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). On the other hand, MMPs are upregulated in invasive melanoma and they are thought to promote melanoma dissemination, probably through different mechanisms since different MMPs are thought to have pro- or anti-invasive effects (Overall and Lopez-Otin, 2002).

### **3.3 PEDF as a brake for melanoma progression**

As previously mentioned, the antiangiogenic activity of PEDF prompted the study of its potential antitumor effects. We (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2004) and others (Abe *et al.*, 2004; Doll *et al.*, 2003; Ek *et al.*, 2006b) described a complex mechanism underlying the potent inhibition of melanoma metastasis by PEDF. PEDF's antitumor activity in melanoma and other tumors is based on its dual action on the tumor microenvironment and on the tumor cells themselves (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007). PEDF inhibits tumor angiogenesis by means of induction of apoptosis on endothelial cells and modulation of the angiogenic profile of melanoma cells, eventually destroying the main source of nutrients to the primary tumor as well as one of the main routes of dissemination to distant organs. Additionally, PEDF exerts a potent inhibitory action on melanoma cells, inducing apoptosis under stress conditions (such as absence of growth factors or detachment from the extracellular matrix) and abrogating migration and invasion. As a whole, PEDF overexpression in melanoma cells leads to a decrease in primary tumor growth

and an inhibition of lung metastasis formation (Fernandez-Garcia *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009).

In the previous section we described that PEDF is produced by low aggressive melanomas. Given that cutaneous melanoma develops from skin melanocytes, two questions soon arise: i) are normal melanocytes expressing this factor endogenously?, ii) if so, which could be the role of PEDF in normal melanocytic cells? By means of assessing a large collection of primary cultures of cutaneous melanocytes and other cell types of the skin we found that melanocytes secrete very high levels of PEDF comparable to other cell types known to express this factor (Orgaz *et al.*, 2009). In agreement with previous reports, dermal fibroblasts also express high levels of PEDF, which has been described to be involved in the control of their proliferative potential (Francis *et al.*, 2004; Tresini *et al.*, 1999); additionally, PEDF secreted by fibroblasts could also play a role in maintaining a correct vascularization of the skin. In contrast, PEDF is expressed at very low levels by epidermal keratinocytes or microvascular endothelial cells (Orgaz *et al.*, 2009).

In melanocytes, PEDF is one of the players involved in the regulation of their proliferation and migratory ability (Fig. 1). PEDF silencing in primary melanocytes leads to an increase in their migration and invasion, as well as a moderate augment in their growth rate (Orgaz *et al.*, 2009). Melanocytes arise from highly migratory embryonic neural crest progenitors, and therefore display an enormous migratory potential (Gupta *et al.*, 2005; Zbytek *et al.*, 2008) that must be tightly controlled in the skin (Hsu *et al.*, 2002). In addition to the regulatory signals from adjacent keratinocytes, an additional brake to their uncontrolled dissemination could be self-imposed within melanocytes by expressing high levels of PEDF themselves. As suggested for the fibroblasts, melanocytes could be also participating in the maintenance of appropriate angiogenesis in the skin by secreting this potent antiangiogenic factor, taking into account previous studies reporting an excessive vascularization of multiple organs upon PEDF knockdown (Doll *et al.*, 2003). Additional paracrine actions on other cell types, keratinocytes for instance, remain to be investigated.

Importantly, recent evidence points to a possible role of PEDF in melanocytic lineage-specific functions, such as pigment production. Melanocytes utilize specialized membrane vesicles called melanosomes to synthesize, store and deliver melanin to the cell membrane, eventually being transferred to surrounding keratinocytes (Barral and Seabra, 2004; Lin and Fisher, 2007). In a recent study we have found that PEDF overexpression in melanoma cell lines modulates the expression of Rab27A and melanophilin, two regulators of melanosome trafficking and melanin transfer (Orgaz *et al.*, 2011). Accordingly, previous reports had proposed the involvement of PEDF in pigment production, as PEDF was found in immature melanosomes of melanoma cells (Chi *et al.*, 2006) and it was also shown to induce tyrosinase expression (Abul-Hassan *et al.*, 2000) and melanosome maturation in RPE cells (Malchiodi-Albedi *et al.*, 1998). However, further studies are warranted in order to elucidate the functional role of PEDF in melanin production and/or secretion.



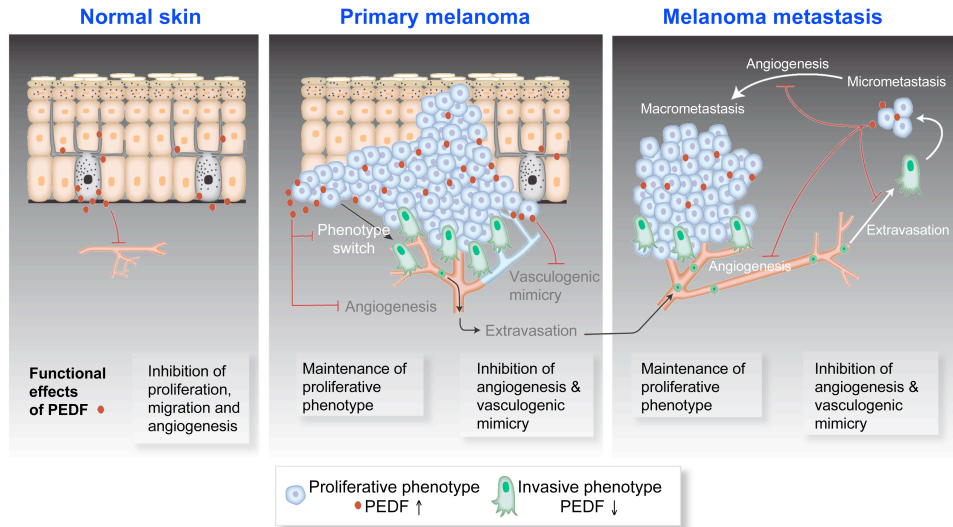


Fig. 1. Regulation of expression of PEDF during melanoma progression and functional effects in melanocytes and melanoma cells. Skin melanocytes express high levels of PEDF, which contribute to restrict their migratory and proliferative ability, and to regulate skin vascularization. In melanoma, PEDF expression is regulated by yet unidentified mechanisms that determine high levels in proliferative phenotype cells, and low levels in invasive phenotype cells. Melanoma progression is driven by switching between proliferative and invasive phenotypes, which involves reprogramming of PEDF and heterogeneous expression of this factor in primary and metastatic melanomas.

The high expression of PEDF in skin melanocytes and its antitumor effects in melanoma raise the question whether PEDF expression could be modulated during melanoma development as it takes place in other types of cancer. However, defining melanoma progression is a complex task. Therefore, we utilized different approaches in order to interrogate levels of PEDF during melanoma malignization (Orgaz *et al.*, 2009). When taking into account histopathological criteria (classical model of melanoma progression), PEDF expression is greatly diminished or lost in metastasis-derived melanoma cell lines compared to cell lines established from RGP or VGP tumors, even though we found a significant variability in PEDF levels across melanoma cell lines. Accordingly, PEDF expression is lower in metastatic melanoma biopsies compared to primary melanomas (Orgaz *et al.*, 2009) (Fig. 1).

This first analysis was expanded taking advantage of the vast collection of publicly available gene expression data from large series of melanoma cell lines and primary cultures of melanocytes. Firstly, we confirmed the downregulation of PEDF expression in melanoma compared to primary melanocytes (Fig. 1) (Hoek, 2007; Orgaz *et al.*, 2009). When classifying

a number of series of melanoma cell lines regarding their gene expression profile into proliferative or invasive phenotype, we found that there is a significant decrease of PEDF expression in invasive phenotype melanoma cell lines. This suggests again an inverse correlation between melanoma aggressiveness and invasiveness, and expression levels of PEDF (Orgaz *et al.*, 2009).

Furthermore, expression of PEDF is subject to certain plasticity and can be reprogrammed during the metastatic progression of melanoma. We utilized paired cell lines isolated from the same metastasis of a cutaneous melanoma patient, and that display extreme phenotypes, poorly or highly aggressive (Seftor *et al.*, 2005). Only the poorly aggressive melanoma cell line expresses PEDF at high levels comparable to those of melanocytes, while it is undetectable in the highly aggressive cell line. The heterogeneity of PEDF expression is also found *in vivo* when analyzed in biopsies from dermal or lymph node melanoma metastases. Most of the biopsies from metastases are negative for PEDF, but when positive they display a heterogeneous staining pattern of PEDF expression (Orgaz *et al.*, 2009). Both observations strongly suggest that PEDF expression could be reprogrammed during the metastatic process in melanoma, in the context of the phenotype switching model, being expressed only by the poorly aggressive subpopulation of tumor cells (Fig. 1). Regulatory signals from the tumor microenvironment could be responsible, at least in part, for this switching in PEDF expression. As an example, primary melanocytes grown on collagen matrix preconditioned by a highly aggressive melanoma cell line display decreased PEDF expression levels compared to melanocytes grown on untreated matrix (Seftor *et al.*, 2005).

The inverse correlation between melanoma aggressiveness and PEDF expression raises additional important questions. Firstly, what is the functional significance of PEDF modulation during melanoma progression? We addressed this by silencing endogenous PEDF expression in several melanoma cell lines utilizing short hairpin RNAs specific to PEDF delivered by lentiviral transduction. As in melanocytes, endogenous PEDF restricts the migratory and invasive ability of melanoma cells, which greatly translates *in vivo*: we found that PEDF inhibits spontaneous lung colonization by melanoma cells as well as formation of spontaneous lung metastases from a primary tumor (Orgaz *et al.*, 2009). Inhibition of spontaneous metastases formation by PEDF is particularly noteworthy, since it highlights that this factor also restricts the initial steps of the metastatic cascade, local invasiveness from the primary tumor and intravasation. Additionally, PEDF impinges on vasculogenic mimicry ability of melanoma cells (Fig. 1), diminishing the formation of vasculogenic networks by melanoma cells both *in vitro* on collagen matrices and *in vivo* in the lung parenchyma after tail vein injection into immunocompromised mice (Orgaz *et al.*, 2009).

Therefore, in the model that we propose reprogramming of PEDF expression is important for the switching between proliferative and invasive phenotypes that are thought to drive metastatic progression of melanoma. Unknown mechanisms so far determine that PEDF expression is high in proliferative phenotype primary tumor cells, where it restricts migratory and invasive abilities, angiogenic potential and vasculogenic mimicry, as a whole leading to a diminished metastatic potential. However, loss of PEDF helps melanoma cells to acquire an invasive phenotype essential to disseminate and colonize distant organs. There, some metastatic cells would be reprogrammed by signals from the new microenvironment towards proliferative phenotype cells, switching back to express PEDF

again. Eventually these cells will develop micrometastases and macrometastases, where additional reprogramming events will take place leading to a metastatic lesion heterogeneous for PEDF expression. Additionally, mechanisms yet to be described determine a loss of PEDF expression in fully developed melanoma metastases (Fig. 1).

Despite the knowledge we have gathered regarding PEDF modulation in melanoma, important questions still remain to be resolved. First of all, which are the regulators of PEDF during melanoma progression? Elucidating the mechanisms that promote or repress PEDF expression would help better understand how PEDF changes in the course of transformation and malignant progression of melanoma. Our results suggest that PEDF expression could be modulated by two general types of mechanisms, reprogramming events and loss of expression.

Assessing PEDF expression during maturation and migration of neural crest precursors towards epidermis could allow investigating the relationship between migratory potential and differentiation state and PEDF expression in a physiological context. Eventually this could also help to identify possible factors involved in reprogramming PEDF in the different environments that neural crest precursors encounter in their way towards epidermis. Some of these factors are likely to be responsible for modulating PEDF expression in melanoma cells, given that tumor cells frequently activate signaling pathways and utilize regulatory mechanisms typical of progenitor cells.

Signals from the microenvironment such as hypoxia and inflammation are thought to reprogram and switch melanoma cells towards an invasive phenotype, and therefore, could be responsible for the downregulation of PEDF during melanoma progression. As a matter of fact, earlier reports described that PEDF expression is decreased by hypoxia in retinoblastoma (Dawson *et al.*, 1999) and RPE (Notari *et al.*, 2005). Additionally, transcription factors that drive and are at the core of each phenotype gene signature could be direct regulators of PEDF expression. MITF is an appealing candidate, since it is a key factor in melanoma and melanocyte biology (Levy *et al.*, 2006) with anti-invasive effects and whose expression is tightly associated with the proliferative phenotype (Carreira *et al.*, 2006; Hoek *et al.*, 2008). Similar to PEDF, some studies have reported a trend towards loss of MITF expression in metastases compared to primary melanomas (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008).

Additionally, genetic and epigenetic mechanisms could lead to a loss of PEDF expression as melanoma evolves to metastatic. The expression of a number of angiogenesis regulators in cancer is controlled by gain of expression of oncogenes and loss of tumor suppressors (Bouck, 1990). PEDF is a direct target of p53-related p63 and p73 proteins in colorectal carcinoma (Sasaki *et al.*, 2005). In melanoma, TA-p73 isoform has been recently described to inhibit anchor independent growth through KCNK1 protein, whose expression decreases in melanoma compared to normal skin (Beitzinger *et al.*, 2008). Therefore it would be interesting to assess whether p73 is implicated in regulating PEDF expression during melanoma progression. Human melanomas display either oncogenic NRAS (20% melanomas) or BRAF (50-70%), thought to be responsible of the initial transformation of melanocytes, uncoupling cell growth from external mitogenic stimuli (Chin, 2003; Chin *et al.*, 2006). However, by means of an analysis of publicly available microarray data from melanoma cell lines, we did not observe a significant correlation between PEDF expression

levels and BRAF or NRAS mutation status (unpublished data). Finally, loss of expression of PEDF could occur upon epigenetic silencing of its promoter. Maspin, another member of Serpin family with anti-invasive and anti-tumor activities, is expressed at high levels in melanocytes but it is silenced in naevi and melanomas by epigenetic mechanisms (Denk *et al.*, 2007).

Although molecular aspects of the mechanism of action of PEDF on endothelial cells or neural derived cells have been described little is known about the molecular mechanisms underlying PEDF's actions in melanoma, particularly in the inhibition of invasion and metastasis.

Interestingly, a recent study by us utilizing a gene expression analysis upon PEDF overexpression in melanoma cell lines has started to reveal some factors and pathways that could be mediating PEDF antimetastatic effects (Orgaz *et al.*, 2011). PEDF downregulates several key promigratory and proangiogenic factors such as IL-8, TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ , as well as a number of proteases and extracellular matrix proteins, like collagen IV, that could account for the lesser invasive ability and angiogenic potential of melanoma cells expressing PEDF. Additionally, PEDF modulates genes previously involved in melanoma progression towards a trend in agreement with decreased aggressiveness and invasiveness, such as factors from the Notch (Pinnix and Herlyn, 2007) or Wnt (Weeraratna, 2005) pathways, as well as FGF13 (Hoek *et al.*, 2004), insuling-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) (Xi *et al.*, 2006) or inhibin beta A (INHBA) (Hoek *et al.*, 2006), among many others. Interestingly, a number of melanoma markers with increased levels upon melanoma malignization are predominantly downregulated by PEDF overexpression, such as MIA or S100- $\beta$  (Deichmann *et al.*, 1999; Utikal *et al.*, 2007).

## **4. Therapeutic applications of pigment epithelium derived factor**

### **4.1 Biochemical features of PEDF**

Therapeutic applications of PEDF are closely related to the cellular niches where this factor is produced and to the multiplicity of cellular functions and activities ascribed to this secreted serpin family member.

SERPINS are a large superfamily of genes that codes for serine protease inhibitors in mammals (Tombran-Tink *et al.*, 2005). These proteins are able to control several processes such as blood coagulation, complement activation and extracellular matrix remodelling (Filleur *et al.*, 2009; Tombran-Tink *et al.*, 2005). However, there is a small number of serpin family members with non-inhibitory protease activity, among which is included PEDF (*SERPINF1*) (Becerra *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1990; Steele *et al.*, 1993). The inhibitory activity against proteinases resides in a domain called reactive centre loop (RCL). The reason why PEDF lacks protease inhibitory capability is due to the presence in the RCL of several proline residues preceding the cleavage site (Simonovic *et al.*, 2001).

Amino acid analyses indicate that PEDF shares considerable sequence homology with other members of the serpin family (Steele *et al.*, 1993); however, residues 40-67, at the N-terminal (N-ter) region, and residues 277-301 at C-terminal (C-ter) are specific to PEDF. This feature

suggests that these residues could be involved in maintaining the distinct structure of PEDF in these regions or in determining specific functions of this non-inhibitory serpin (Tombran-Tink *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Tombran-Tink and collaborators also compared sequence homology of PEDF protein among different species and analyzed structural homology. They found a high degree of conservation in the leader sequence, responsible for protein secretion, a C-ter glycosylation site, and four specific regions: two domains present at N-ter region, corresponding to residues 40-67 and 78-95; and other two regions, 277-301 and 384-415, located at C-ter of the protein (Tombran-Tink *et al.*, 2005).

PEDF was initially isolated from conditioned medium of human fetal RPE cells and identified as a neurotrophic factor (Tombran-Tink and Johnson, 1989), although further studies showed that it is widely expressed throughout fetal and adult tissues (Ek *et al.*, 2006b). This broad expression is suggestive of a general and relevant function of PEDF in mammals. PEDF is also known as EPC-1 (early population doubling cDNA-1), and has been shown to participate in cell cycle regulation, initially in fibroblasts (Pignolo *et al.*, 1993; Tombran-Tink and Johnson, 1989; Tombran-Tink *et al.*, 1995) and later in other cell types like endothelial cells (Duh *et al.*, 2002; Hutchings *et al.*, 2002). PEDF's cell cycle regulatory function requires the presence of a putative nuclear localization sequence (residues 141-151) that is highly conserved in *SERPINF1* among different species, and could mediate PEDF translocation to the nucleus (Tombran-Tink *et al.*, 2005). One of the most relevant functional characteristics of PEDF is its antiangiogenic activity, being considered as the most potent natural inhibitor of physiological and pathological angiogenesis (Dawson *et al.*, 1999). PEDF is also a very effective neurotrophic factor that induces cell differentiation, cell survival, and protection from cell death in many cell types of the nervous system. PEDF prevents degeneration of retinal neurons that are exposed to transient ischemic reperfusion (Ogata *et al.*, 2001), and also protects other regions of the brain and spinal cord from the damaging effects caused by oxidative stress and glutamate toxicity (Bilak *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1999; DeCoster *et al.*, 1999; Taniwaki *et al.*, 1995). It has been shown the implication of NFkB in all these processes, which induces the expression of neurotrophic factors and anti-apoptotic genes that participate in the control of cell survival, proliferation and death (Barnstable and Tombran-Tink, 2004; Yabe *et al.*, 2001). Neurotrophic activity has been mapped to the N-ter region of PEDF, encompassing residues Val<sup>58</sup>-Thr<sup>101</sup> (Simonovic *et al.*, 2001). This region is involved in binding to a putative plasma membrane receptor in cerebellar granule neurons and retinoblastoma cells (Alberdi *et al.*, 1999). PEDF is also secreted by ependymal and endothelial cells from the subventricular zone of the brain, where it promotes the self-renewal of adult neural stem cells (Andreu-Agullo *et al.*, 2009; Ramirez-Castillejo *et al.*, 2006). Furthermore, PEDF presents three phosphorylation sites located in Ser<sup>24</sup>, Ser<sup>114</sup> and Ser<sup>227</sup>, and the regulation of their phosphorylation state modulates the switch of PEDF's function from neurotrophic (Ser<sup>24</sup> and Ser<sup>114</sup> phosphorylated) to angiangiogenic (Ser<sup>227</sup> phosphorylated) (Becerra, 2006).

In order to better understand the mechanism of action of PEDF, it was necessary to identify the structural domains responsible for each of its described biological functions. Two major epitopes were identified at the N-ter region of PEDF: 34-mer peptide (residues 24-57) responsible of the antiangiogenic and pro-apoptotic actions of PEDF; and a second epitope, 44-mer peptide (residues 58-101), which induces neuronal differentiation of retinoblastoma cells (Filleur *et al.*, 2005) and plays a neurotrophic role in many neuronal cell types (Bilak *et al.*, 2002). There are another two highly conserved smaller epitopes, one upstream 34-mer,

the TGA epitope, and an internal fragment of 44-mer, referred to as ERT. Filleur and collaborators showed *in vivo* that the epitopes TGA and the complete 34-mer inhibit tumour angiogenesis in prostate adenocarcinoma by inducing apoptosis of endothelial cells and blocking endothelial cell migration. Curiously, ERT despite of being located inside the neurotrophic 44-mer peptide, also presents antiangiogenic activity in prostate adenocarcinoma. Complete 44-mer is able to induce neurite outgrowth in Y-79 retinoblastoma cell line and causes apoptosis of endothelial cells, blocking migration and angiogenesis (Filleur *et al.*, 2005). In a more recent study, smaller regions of 34-mer epitope (named P14, P18 and P23, according to their respective length) were tested for angioinhibitory activity *in vitro* and *in vivo*. P14 and P23 display antiangiogenic activity *in vitro* (both blocking endothelial chemotaxis, and inducing apoptosis in the case of P23), but not *in vivo*; while P18 is a more potent antiangiogenic peptide than 34-mer in prostate cancer, being able to block bFGF and VEGF-dependent angiogenesis in the *in vivo* cornea neovascularisation assay (Mirochnik *et al.*, 2009). Another study by Ek and colleagues identified other small peptides with antitumoral activity in an orthotopic osteosarcoma model. They generated six 25-mer peptides along the functionally distinct regions of PEDF characterized so far. Residues 78-102 inhibit proliferation, whereas residues 90-114 stimulate adhesion of PEDF to type I collagen. Furthermore, residues 387 to 411 inhibit invasion of osteosarcoma cells *in vitro* and residues 40-64 promote osteogenic differentiation (Ek *et al.*, 2007).

The multifunctional character of PEDF and the evidence of the different roles displayed depending on the cell type, suggest that PEDF could be acting through distinct domains recognized by several specific receptors. The identification of these putative receptors and the characterization of the binding affinity of each functionally identified peptide towards them could make a breakthrough in the understanding of PEDF's mechanism of action and, therefore, the possibility of its therapeutic use in multiple pathological contexts.

## 4.2 PEDF receptors

Several studies have characterized the affinity of PEDF for the surface of human retinoblastoma cells, cerebellar granular neurons (Alberdi *et al.*, 1999), motor neurons (Bilak *et al.*, 2002), neural retina (Aymerich *et al.*, 2001) and endothelial cells (Yamagishi *et al.*, 2004). PEDF could be sequestered in the extracellular matrix based on ionic interactions with sulphated (heparin, heparin sulfate and chondroitin sulfate) (Alberdi *et al.*, 1998), and non-sulfated (hyaluronan) (Becerra *et al.*, 2008) glycosaminoglycans and type I collagen (Meyer *et al.*, 2002). In order to identify the potential receptor(s) of PEDF, Simonovic and collaborators carried out a three-dimensional study of PEDF, and identified an asymmetric charge distribution, with a high acidic region located at C-ter and basic amino acids at opposite region of PEDF protein (Simonovic *et al.*, 2001). This basic region is involved in the binding of PEDF to heparin through three clustered basic amino acid residues, Lys<sup>146</sup>, Lys<sup>147</sup> and Arg<sup>149</sup>. Moreover, Asp<sup>256</sup>, Asp<sup>258</sup> and Asp<sup>300</sup> residues present in the acidic region of PEDF are crucial to type I collagen binding (Meyer *et al.*, 2002; Yasui *et al.*, 2003).

Using the 34-mer and 44-mer epitopes it was possible to propose the existence of two distinct putative receptors for PEDF. These epitopes are able to bind the surface of endothelial and prostate cells, but they do not compete for receptor binding (Filleur *et al.*, 2005). This result suggests the existence of two PEDF receptors with different functions:

PEDF-R<sup>N</sup>, that interacts with 44-mer epitope and regulates the neurotrophic and neuroprotective activities of PEDF; and PEDF-R<sup>A</sup>, which is involved in blocking angiogenesis by binding to 34-mer epitope (Fig. 2). The differential expression of these two putative PEDF receptors in the diverse cell types analyzed supports the idea of distinct functions for each receptor type. PEDF-R<sup>N</sup> is an 80-kDa receptor, which is located on the surface of human retinoblastoma cells, neural retina, cerebellar granular and motor neurons, whereas PEDF-R<sup>A</sup> is a 60-kDa receptor specifically present on endothelial cells (Filleur *et al.*, 2009).

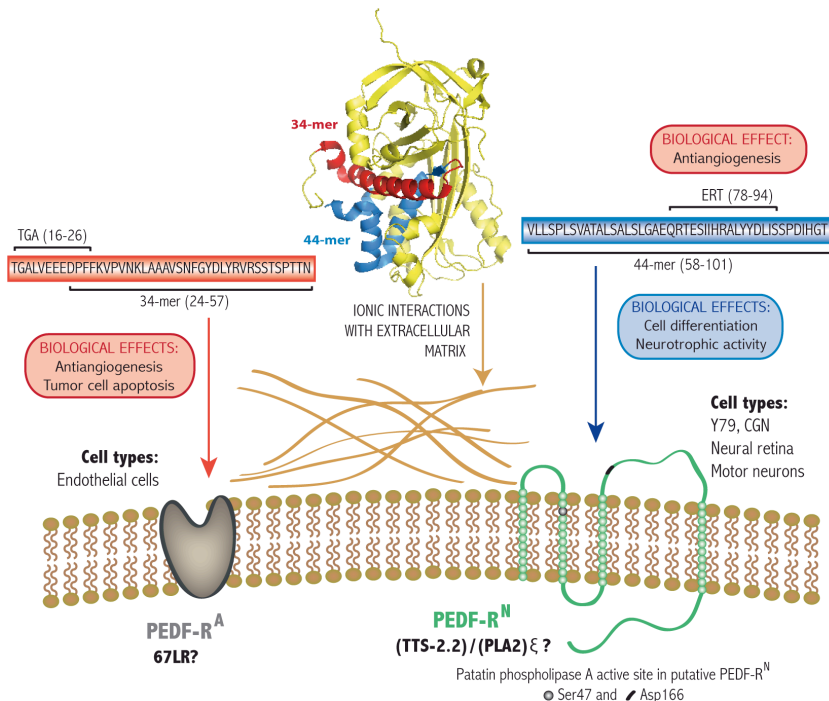


Fig. 2: Three-dimensional structure of PEDF, small peptides derived from PEDF and receptors. Crystal structure of PEDF molecule showing the location of 34-mer and 44-mer peptides. PEDF could be sequestered in the extracellular matrix by ionic interactions with type I collagen and glycosaminoglycans. 34-mer, TGA and ERT peptides display antiangiogenic action through their bind to 60-kDa receptor (PEDF-R<sup>A</sup>, proposed as the non-integrin 67-kDa laminin receptor) in endothelial cells. 34-mer also has the capability to induce apoptosis in tumor cells. 44-mer and ERT peptides present a neurotrophic action through their binding to the TTS-2.2/ (PLA2) ξ receptor (putatively identified as the PEDF-R<sup>N</sup>) in several cell types. Abbreviations: 67LR: Non-Integrin 67-kDa laminin receptor; TTS-2.2/ (PLA2)ξ: Transport secretion protein 2.2/Independent phospholipase A<sub>2</sub>; Y79: human retinoblastoma cell line; CGN: cerebellar granular neurons.

Further studies identified on the surface of the retina and human immortalized retinoblastoma cells (ARPE-19) the human Transport Secretion Protein 2-2 (TTS-

2.2)/Independent phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) $\xi$  (also known in mice as adipose triglyceride lipase-ATGL, desnutrin, and patatin-like phospholipase domain containing protein-PNPLP2), an important lipase involved in triglyceride metabolism, as a specific PEDF receptor (Notari *et al.*, 2006). The phospholipase A<sub>2</sub> domain of this receptor releases bioactive fatty acids that function as second messengers. Therefore, depending on the lipid released, this receptor could activate different signal transduction pathways. It is still not fully demonstrated if the 80-kDa (PLA<sub>2</sub>) $\xi$  receptor is the previously identified PEDF-R<sup>N</sup> receptor (Fig. 2).

Recently, a new receptor for PEDF has been identified, the non-integrin 67-kDa laminin receptor (67LR) (Bernard *et al.*, 2009), which may be related to the 60-kDa receptor previously reported in endothelial cells (Yamagishi *et al.*, 2004). This hypothesis is supported by the observation of antiangiogenic effects (inhibition of endothelial cell migration and induction of endothelial cell apoptosis) when 34-mer epitope binds to 67LR and the previously described 60-kDa receptor.

However, whether these characterized receptors are expressed on the surface of melanocytes and melanoma cells to mediate multiple PEDF's biological activities, and whether other unknown melanocytic lineage-specific receptors could play a role in translating PEDF's effects, remains to be investigated.

### 4.3 Therapeutic prospects for PEDF

During the last two decades many groups have described PEDF as a multifunctional protein that plays effective neuroprotective and antiangiogenic activities. The wide diversity of PEDF functions, along with the fact that it is an endogenous molecule, makes PEDF a unique candidate for a therapeutic agent in many diseases.

Several studies have already shown the role of PEDF in various pathological conditions such as ocular and chronic inflammatory diseases, atherosclerosis and diabetes. Moreover, several groups have demonstrated, *in vivo* and *in vitro*, the antitumor and antimetastatic potential of PEDF. They described the capability of PEDF to induce tumor cell differentiation in neuroblastoma (Crawford *et al.*, 2001) and prostate cancer (Filleur *et al.*, 2005); a direct tumor suppression action in osteosarcoma (Takenaka *et al.*, 2005), melanoma (Abe *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004) and prostate cancer (Filleur *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2007); and its angiostatic action in a wide number of tumor types that include, among others, melanoma (Abe *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; Orgaz *et al.*, 2009; Yang and Grossniklaus, 2010).

The use of PEDF as a therapeutic agent in the clinic requires deeper knowledge of its biological effects and underlying molecular mediators. An important feature is the development of effective therapeutic agents based on the optimum combination of biological activities beneficial for each specific pathological context, together with the development of optimum delivery systems to allow proper targeting and stability during treatment. One of the possibilities is the use of recombinant full-length PEDF protein (rPEDF) produced in human embryonic kidney cells. Also, as PEDF is secreted at high levels by RPE cells, endogenous PEDF protein can be purified from the conditioned medium of RPEs. rPEDF has been successfully tested *in vitro* and *in vivo* in osteosarcoma (Takenaka *et*



*al.*, 2005), prostate cancer (Doll *et al.*, 2003) and neuroblastoma (Crawford *et al.*, 2001). Due to its endogenous nature, short-term treatment would not lead to any immune response after systemic administration. However, the main disadvantage of this strategy is the susceptibility of rPEDF to cleavage by proteases, and therefore a limited bioavailability.

PEDF is a protein that is 418 amino acids in length. Filleur and collaborators elucidated that two small fragments of PEDF, 34-mer and 44-mer, were able to display the antiangiogenic and neurotrophic roles (respectively) as the complete protein (Filleur *et al.*, 2005). Shorter peptides improve the stability and delivery, and reduce the possibility of being recognized by the immune system. However, the use of rPEDF or small peptides derived from functionally active regions requires a systemic distribution; and therefore due to the antiangiogenic activity of this factor or derived peptides, its presence in plasma could have unexplored side effects on physiologic vascularization during the menstrual cycle and wound healing (Ek *et al.*, 2006a).

An alternative strategy that has been widely tested by a number of groups in mouse models of cancer is the use of viral vectors for the delivery of either full length PEDF or small peptides derived from the diverse functional regions identified. Gene transfer using viral or plasmid vectors is an attractive tool for human cancer gene therapy. Several studies have used this strategy in different types of cancer, such as pancreatic cancer (Hase *et al.*, 2005), neuroblastoma (Streck *et al.*, 2005), prostate cancer (Guan *et al.*, 2007) and melanoma (Abe *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; Orgaz *et al.*, 2009; Yang and Grossniklaus, 2010), with a reduction of primary tumor size and number of metastases after PEDF delivery.

In melanoma, Abe's group and us were the first to describe the antitumor effect of PEDF *in vitro* and *in vivo* in malignant melanoma cells lines (Abe *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004). To this aim, Abe and collaborators overexpressed PEDF by transfection of G361 melanoma cell line and observed in nude mice a reduction of tumor angiogenesis and an almost complete inhibition of G361 growth in melanoma xenografts. These effects are the result of suppression of tumor angiogenesis and induction of Fas ligand-dependent apoptosis in tumor cells (Abe *et al.*, 2004). We used a retroviral strategy to transduce the human melanoma cell line UCD-Mel-N, which does not express significant levels of endogenous PEDF. We observed a considerable inhibition of primary tumour growth in subcutaneous xenotransplants in immunocompromised mice and a complete abrogation of lung metastases formation in the tail vein injection model. We demonstrated that the inhibition of primary melanoma tumor growth by PEDF is based on selective destruction of immature vessels, together with a significant direct induction of apoptosis in melanoma cells. Although it was first demonstrated that PEDF inhibits endothelial cell migration and induces apoptosis in remodelling endothelium, we showed that PEDF also has direct effects on melanoma cells, inhibiting melanoma cell migration and inducing apoptosis under stress conditions like absence of growth factors or detachment from the extracellular matrix (Garcia *et al.*, 2004). In a recent work we also used a lentiviral transduction strategy to silence PEDF in poorly aggressive melanoma cell lines with high expression of endogenous PEDF. PEDF knockdown in these melanoma cell lines enables the acquisition of an invasive phenotype, showing the critical importance of PEDF for the malignant progression of human melanoma (Orgaz *et al.*, 2009).

Retroviral and lentiviral vectors are attractive tools for human cancer gene therapy and, based on their ability to integrate into the genome, they have the potential to achieve long-term stable expression and maintain therapeutic levels of secreted peptides (Hase *et al.*, 2005). Both types of virus are able to transduce proliferating cells, although only lentiviruses present the advantage of transducing non-dividing cells. This feature is of great advantage for gene transfer as a complementary treatment in cancer, due to the fact that chemotherapy is only effective in actively proliferative cells, allowing non-dividing cells to be resistant to treatment and enabling the development of metastasis. Although viral systems seem to be a promising therapy for cancer and other diseases, there are still some problems and patient risks that have to be solved, such as (i) obtaining clinically effective viral titres, (ii) stable transgene expression in individuals requiring long-term treatment, and (iii) the risk of *de novo* cancer initiation via recombination within the patient's cell genome.

The biological effect of small peptides derived from PEDF retaining different functional activities has not yet been explored in melanoma, although it would be very relevant for the therapeutic development of PEDF in the context of aggressive melanoma. Also, characterization of PEDF's receptors expressed in melanoma cells is very important in order to understand the molecular mechanism of action underpinning the multiple biological actions of PEDF on melanoma cells, as well as to develop new therapeutic strategies based on the receptors and pathways that mediate PEDF's actions in aggressive melanoma.

## 5. Conclusions

Collectively, our findings strongly support PEDF as a potent biological modifier that effectively halts the metastatic spread of human melanoma by combining distinct functional epitopes respectively impinging on the vascular component of the tumor microenvironment and on the set of capabilities that a melanoma cell must acquire in order to successfully leave its primary site to colonize distant foreign environments.

## 6. Acknowledgment

Supported by grants Ministerio de Educacion y Ciencia SAF2007-62292 and SAF2010-19256 to BJ. AFB has been supported by a CSIC-JAE fellowship and JLO by a SAF2007-62292 contract.

## 7. References

- Abe R., Shimizu T., Yamagishi S., Shibaki A., Amano S., Inagaki Y., Watanabe H., Sugawara H., Nakamura H., Takeuchi M., Imaizumi T., & Shimizu H. (2004). Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol* 164: 1225-32.
- Abramson LP., Stellmach V., Doll JA., Cornwell M., Arensman RM., & Crawford SE. (2003). Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg* 38: 336-42; discussion 336-42.

- Abul-Hassan K., Walmsley R., Tombran-Tink J., & Boulton M. (2000). Regulation of tyrosinase expression and activity in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Pigment Cell Res* 13: 436-41.
- al-Alousi S., Carlson JA., Blessing K., Cook M., Karaoli T., & Barnhill RL. (1996). Expression of basic fibroblast growth factor in desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol* 23: 118-25.
- Alberdi E., Hyde CC., & Bercerra SP. (1998). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site. *Biochemistry* 37: 10643-52.
- Alberdi E., Aymerich MS., & Bercerra SP. (1999). Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* 274: 31605-12.
- Albino AP., Davis BM., & Nanus DM. (1991). Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Res* 51: 4815-20.
- Andreu-Agullo C., Morante-Redolat JM., Delgado AC., & Farinas I. (2009). Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 12: 1514-23.
- Aurora AB., Biyashev D., Mirochnik Y., Zaichuk TA., Sanchez-Martinez C., Renault MA., Losordo D., & Volpert OV. (2010). NF-kappaB balances vascular regression and angiogenesis via chromatin remodeling and NFAT displacement. *Blood* 116: 475-84.
- Aymerich MS., Alberdi EM., Martinez A., & Bercerra SP. (2001). Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 3287-93.
- Baluk P., Hashizume H., & McDonald DM. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15: 102-11.
- Barnstable CJ., & Tombran-Tink J. (2004). Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 23: 561-77.
- Barral DC., & Seabra MC. (2004). The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res* 17: 111-8.
- Basu B., Biswas S., Wrigley J., Sirohi B., & Corrie P. (2009). Angiogenesis in cutaneous malignant melanoma and potential therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 9: 1583-98.
- Bercerra SP., Sagasti A., Spinella P., & Notario V. (1995). Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J Biol Chem* 270: 25992-9.
- Bercerra SP. (2006). Focus on Molecules: Pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Exp Eye Res* 82: 739-40.
- Bercerra SP., Perez-Mediavilla LA., Weldon JE., Locatelli-Hoops S., Senanayake P., Notari L., Notario V., & Hollyfield JG. (2008). Pigment epithelium-derived factor binds to hyaluronan. Mapping of a hyaluronan binding site. *J Biol Chem* 283: 33310-20.
- Bedogni B., & Powell MB. (2009). Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 166-74.
- Beitzinger M., Hofmann L., Oswald C., Beinoraviciute-Kellner R., Sauer M., Griesmann H., Bretz AC., Burek C., Rosenwald A., & Stiewe T. (2008). p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *Embo J* 27: 792-803.

- Bergers G., & Hanahan D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 592-603.
- Bernard A., Gao-Li J., Franco CA., Bouceba T., Huet A., & Li Z. (2009). Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 284: 10480-90.
- Bilak MM., Corse AM., Bilak SR., Lehar M., Tombran-Tink J., & Kuncel RW. (1999). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 719-28.
- Bilak MM., Becerra SP., Vincent AM., Moss BH., Aymerich MS., & Kuncel RW. (2002). Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* 22: 9378-86.
- Bittner M., Meltzer P., Chen Y., Jiang Y., Seftor E., Hendrix M., Radmacher M., Simon R., Yakhini Z., Ben-Dor A., Sampas N., Dougherty E., Wang E., Marincola F., Gooden C., Lueders J., Glatfelter A., Pollock P., Carpten J., Gillanders E., Leja D., Dietrich K., Beaudry C., Berens M., Alberts D., & Sondak V. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406: 536-40.
- Bosserhoff AK. (2005). Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. *Pigment Cell Res* 18: 411-6.
- Bouck N. (1990). Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* 2: 179-85.
- Bouck N. (2002). PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 8: 330-4.
- Broadhead ML., Dass CR., & Choong PF. (2009). In vitro and in vivo biological activity of PEDF against a range of tumors. *Expert Opin Ther Targets* 13: 1429-38.
- Cai J., Parr C., Watkins G., Jiang WG., & Boulton M. (2006). Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 12: 3510-7.
- Cao W., Tombran-Tink J., Chen W., Mrazek D., Elias R., & McGinnis JF. (1999). Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* 57: 789-800.
- Carmeliet P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-6.
- Carreira S., Goodall J., Denat L., Rodriguez M., Nuciforo P., Hoek KS., Testori A., Larue L., & Goding CR. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20: 3426-39.
- Chi A., Valencia JC., Hu ZZ., Watabe H., Yamaguchi H., Mangini NJ., Huang H., Canfield VA., Cheng KC., Yang F., Abe R., Yamagishi S., Shabanowitz J., Hearing VJ., Wu C., Appella E., & Hunt DF. (2006). Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* 5: 3135-44.
- Chin L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 3: 559-70.
- Chin L., Garraway LA., & Fisher DE. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20: 2149-82.
- Clark WH, Jr. (1991). Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 10: 83-88.
- Crawford SE., Stellmach V., Ranalli M., Huang X., Huang L., Volpert O., De Vries GH., Abramson LP., & Bouck N. (2001). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* 114: 4421-8.

- Dawson DW., Volpert OV., Gillis P., Crawford SE., Xu H., Benedict W., & Bouck NP. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285: 245-8.
- De Wever O., Nguyen QD., Van Hoorde L., Bracke M., Bruyneel E., Gespach C., & Mareel M. (2004). Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 18: 1016-8.
- DeCoster MA., Schabelman E., Tombran-Tink J., & Bazan NG. (1999). Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 56: 604-10.
- Deichmann M., Benner A., Bock M., Jackel A., Uhl K., Waldmann V., & Naher H. (1999). S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 17: 1891-6.
- Denk AE., Bettstetter M., Wild PJ., Hoek K., Bataille F., Dietmaier W., & Bosserhoff AK. (2007). Loss of maspin expression contributes to a more invasive potential in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 20: 112-9.
- Doll JA., Stellmach VM., Bouck NP., Bergh AR., Lee C., Abramson LP., Cornwell ML., Pins MR., Borensztajn J., & Crawford SE. (2003). Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 9: 774-80.
- Duh EJ., Yang HS., Suzuma I., Miyagi M., Youngman E., Mori K., Katai M., Yan L., Suzuma K., West K., Davarya S., Tong P., Gehlbach P., Pearlman J., Crabb JW., Aiello LP., Campochiaro PA., & Zack DJ. (2002). Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 821-9.
- Ek ET., Dass CR., & Choong PF. (2006a). PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med* 12: 497-502.
- Ek ET., Dass CR., & Choong PF. (2006b). Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther* 5: 1641-6.
- Ek ET., Dass CR., Contreras KG., & Choong PF. (2007). PEDF-derived synthetic peptides exhibit antitumor activity in an orthotopic model of human osteosarcoma. *J Orthop Res* 25: 1671-80.
- Ellis LM., & Hicklin DJ. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 8: 579-91.
- Fecher LA., Cummings SD., Keefe MJ., & Alani RM. (2007). Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 25: 1606-20.
- Fernandez-Garcia NI., Volpert OV., & Jimenez B. (2007). Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* 85: 15-22.
- Ferrara N., & Kerbel RS. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-74.
- Filleur S., Volz K., Nelius T., Mirochnik Y., Huang H., Zaichuk TA., Aymerich MS., Becerra SP., Yap R., Veliceasa D., Shroff EH., & Volpert OV. (2005). Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 5144-52.
- Filleur S., Nelius T., de Riese W., & Kennedy RC. (2009). Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem* 106: 769-75.
- Folberg R., Hendrix MJ., & Maniotis AJ. (2000). Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156: 361-81.
- Folkman J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57: 1-18.

- Francis MK., Appel S., Meyer C., Balin SJ., Balin AK., & Cristofalo VJ. (2004). Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging in vivo. *J Invest Dermatol* 122: 1096-105.
- Gaggioli C., & Sahai E. (2007). Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* 20: 161-72.
- Gao D., Nolan DJ., Mellick AS., Bambino K., McDonnell K., & Mittal V. (2008). Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 319: 195-8.
- Garcia M., Fernandez-Garcia NI., Rivas V., Carretero M., Escamez MJ., Gonzalez-Martin A., Medrano EE., Volpert O., Jorcano JL., Jimenez B., Larcher F., & Del Rio M. (2004). Inhibition of xenografted human melanoma growth and prevention of metastasis development by dual antiangiogenic/antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Res* 64: 5632-42.
- Goodall J., Carreira S., Denat L., Kobi D., Davidson I., Nuciforo P., Sturm RA., Larue L., & Goding CR. (2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res* 68: 7788-94.
- Goss PE., & Chambers AF. (2010). Does tumour dormancy offer a therapeutic target? *Nat Rev Cancer* 10: 871-7.
- Gray-Schopfer V., Wellbrock C., & Marais R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445: 851-7.
- Guan M., Yam HF., Su B., Chan KP., Pang CP., Liu WW., Zhang WZ., & Lu Y. (2003). Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol* 56: 277-82.
- Guan M., Jiang H., Xu C., Xu R., Chen Z., & Lu Y. (2007). Adenovirus-mediated PEDF expression inhibits prostate cancer cell growth and results in augmented expression of PAI-2. *Cancer Biol Ther* 6: 419-25.
- Gupta PB., Kuperwasser C., Brunet JP., Ramaswamy S., Kuo WL., Gray JW., Naber SP., & Weinberg RA. (2005). The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 37: 1047-54.
- Halin S., Wikstrom P., Rudolfsson SH., Stattin P., Doll JA., Crawford SE., & Bergh A. (2004). Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. *Cancer Res* 64: 5664-71.
- Halin S., Rudolfsson SH., Doll JA., Crawford SE., Wikstrom P., & Bergh A. (2010). Pigment epithelium-derived factor stimulates tumor macrophage recruitment and is downregulated by the prostate tumor microenvironment. *Neoplasia* 12: 336-45.
- Hanahan D., & Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hanahan D., & Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74.
- Haqq C., Nosrati M., Sudilovsky D., Crothers J., Khodabakhsh D., Pulliam BL., Federman S., Miller JR, 3rd., Allen RE., Singer ML., Leong SP., Ljung BM., Sagebiel RW., & Kashani-Sabet M. (2005). The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 6092-7.
- Hase R., Miyamoto M., Uehara H., Kadoya M., Ebihara Y., Murakami Y., Takahashi R., Mega S., Li L., Shichinohe T., Kawarada Y., & Kondo S. (2005). Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. *Clin Cancer Res* 11: 8737-44.
- Helfrich I., Scheffrahn I., Bartling S., Weis J., von Felbert V., Middleton M., Kato M., Ergun S., & Schadendorf D. (2010). Resistance to antiangiogenic therapy is directed by

- vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med* 207: 491-503.
- Helfrich I., & Schadendorf D. (2011). Blood vessel maturation, vascular phenotype and angiogenic potential in malignant melanoma: One step forward for overcoming anti-angiogenic drug resistance? *Mol Oncol*.
- Hendrix MJ., Seftor EA., Hess AR., & Seftor RE. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-21.
- Hendrix MJ., Seftor EA., Seftor RE., Kasemeier-Kulesa J., Kulesa PM., & Postovit LM. (2007). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* 7: 246-55.
- Hess AR., Margaryan NV., Seftor EA., & Hendrix MJ. (2007). Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. *Dev Dyn* 236: 3283-96.
- Hoek K., Rimm DL., Williams KR., Zhao H., Ariyan S., Lin A., Kluger HM., Berger AJ., Cheng E., Trombetta ES., Wu T., Niinobe M., Yoshikawa K., Hannigan GE., & Halaban R. (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 64: 5270-82.
- Hoek KS., Schlegel NC., Brafford P., Sucker A., Ugurel S., Kumar R., Weber BL., Nathanson KL., Phillips DJ., Herlyn M., Schadendorf D., & Dummer R. (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 19: 290-302.
- Hoek KS. (2007). DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment Cell Res* 20: 466-84.
- Hoek KS., Eichhoff OM., Schlegel NC., Dobbeling U., Kobert N., Schaerer L., Hemmi S., & Dummer R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 68: 650-6.
- Hoek KS. (2009). Melanoma progression, gene expression and DNA microarrays. *G Ital Dermatol Venereol* 144: 39-49.
- Hoshina D., Abe R., Yamagishi SI., & Shimizu H. (2010). The role of PEDF in tumor growth and metastasis. *Curr Mol Med* 10: 292-5.
- Hsu MY., Meier F., & Herlyn M. (2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70: 522-36.
- Hutchings H., Maitre-Boube M., Tombran-Tink J., & Plouet J. (2002). Pigment epithelium-derived factor exerts opposite effects on endothelial cells of different phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 764-9.
- Jain RK. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-93.
- Jain RK. (2008). Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 309-16.
- Jimenez B., & Volpert OV. (2001). Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *J Mol Med* 78: 663-72.
- Jubb AM., Oates AJ., Holden S., & Koeppen H. (2006). Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer* 6: 626-35.
- Kajita M., McClinic KN., & Wade PA. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 24: 7559-66.
- Kerbel RS. (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358: 2039-49.
- Kopp HG., Ramos CA., & Rafii S. (2006). Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol* 13: 175-81.

- Kuphal S., Palm HG., Poser I., & Bosserhoff AK. (2005). Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res* 15: 305-13.
- Laquer V., Hoang V., Nguyen A., & Kelly KM. (2009). Angiogenesis in cutaneous disease: part II. *J Am Acad Dermatol* 61: 945-58; quiz 959-60.
- Lawrence DA., Strandberg L., Ericson J., & Ny T. (1990). Structure-function studies of the SERPIN plasminogen activator inhibitor type 1. Analysis of chimeric strained loop mutants. *J Biol Chem* 265: 20293-301.
- Levy C., Khaled M., & Fisher DE. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12: 406-14.
- Lin JY., & Fisher DE. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445: 843-50.
- Loges S., Roncal C., & Carmeliet P. (2009). Development of targeted angiogenic medicine. *J Thromb Haemost* 7: 21-33.
- Lomuto M., Calabrese P., & Giuliani A. (2004). Prognostic signs in melanoma: state of the art. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18: 291-300.
- Mahabeleshwar GH., & Byzova TV. (2007). Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol* 34: 555-65.
- Malchiodi-Albedi F., Feher J., Caiazza S., Formisano G., Perilli R., Falchi M., Petrucci TC., Scordia G., & Tombran-Tink J. (1998). PEDF (pigment epithelium-derived factor) promotes increase and maturation of pigment granules in pigment epithelial cells in neonatal albino rat retinal cultures. *Int J Dev Neurosci* 16: 423-32.
- Maniotis AJ., Folberg R., Hess A., Seftor EA., Gardner LM., Pe'er J., Trent JM., Meltzer PS., & Hendrix MJ. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155: 739-52.
- Matsumoto K., Ishikawa H., Nishimura D., Hamasaki K., Nakao K., & Eguchi K. (2004). Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 40: 252-9.
- McGill GG., Haq R., Nishimura EK., & Fisher DE. (2006). c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. *J Biol Chem* 281: 10365-73.
- Meyer C., Notari L., & Becerra SP. (2002). Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* 277: 45400-7.
- Michaloglou C., Vredeveld LC., Soengas MS., Denoyelle C., Kuilman T., van der Horst CM., Majoor DM., Shay JW., Mooi WJ., & Peeper DS. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436: 720-4.
- Miller AJ., & Mihm MC, Jr. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* 355: 51-65.
- Mirochnik Y., Aurora A., Schulze-Hoepfner FT., Deabes A., Shifrin V., Beckmann R., Polsky C., & Volpert OV. (2009). Short pigment epithelial-derived factor-derived peptide inhibits angiogenesis and tumor growth. *Clin Cancer Res* 15: 1655-63.
- Nguyen A., Hoang V., Laquer V., & Kelly KM. (2009a). Angiogenesis in cutaneous disease: part I. *J Am Acad Dermatol* 61: 921-42; quiz 943-4.
- Nguyen DX., Bos PD., & Massague J. (2009b). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9: 274-84.
- Nico B., Benagiano V., Mangieri D., Maruotti N., Vacca A., & Ribatti D. (2008). Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 23: 601-7.
- Notari L., Miller A., Martinez A., Amaral J., Ju M., Robinson G., Smith LE., & Becerra SP. (2005). Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2736-47.



- Notari L., Baladron V., Aroca-Aguilar JD., Balko N., Heredia R., Meyer C., Notario PM., Saravanamuthu S., Nueda ML., Sanchez-Sanchez F., Escribano J., Laborda J., & Becerra SP. (2006). Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 281: 38022-37.
- Nowell PC. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-8.
- Ogata N., Wang L., Jo N., Tombran-Tink J., Takahashi K., Mrazek D., & Matsumura M. (2001). Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res* 22: 245-52.
- Orgaz JL., Martinez-Poveda B., Fernandez-Garcia NI., & Jimenez B. (2008). Following up tumour angiogenesis: from the basic laboratory to the clinic. *Clin Transl Oncol* 10: 468-77.
- Orgaz JL., Ladhani O., Hoek KS., Fernandez-Barral A., Mihic D., Aguilera O., Seftor EA., Bernad A., Rodriguez-Peralto JL., Hendrix MJ., Volpert OV., & Jimenez B. (2009). 'Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma'. *Oncogene* 28: 4147-61.
- Orgaz JL., Benguria A., Sanchez-Martinez C., Ladhani O., Volpert O., & Jimenez B. (2011). Changes in the gene expression profile of A375 human melanoma cells induced by over-expression of multifunctional pigment epithelium-derived factor. *Melanoma Res In Press*.
- Overall CM., & Lopez-Otin C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2: 657-72.
- Pavey S., Johansson P., Packer L., Taylor J., Stark M., Pollock PM., Walker GJ., Boyle GM., Harper U., Cozzi SJ., Hansen K., Yudt L., Schmidt C., Hersey P., Ellem KA., O'Rourke MG., Parsons PG., Meltzer P., Ringner M., & Hayward NK. (2004). Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. *Oncogene* 23: 4060-7.
- Pignolo RJ., Cristofalo VJ., & Rotenberg MO. (1993). Senescent WI-38 cells fail to express EPC-1, a gene induced in young cells upon entry into the G0 state. *J Biol Chem* 268: 8949-57.
- Pinnix CC., & Herlyn M. (2007). The many faces of Notch signaling in skin-derived cells. *Pigment Cell Res* 20: 458-65.
- Postovit LM., Seftor EA., Seftor RE., & Hendrix MJ. (2006). Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. *Cancer Res* 66: 7833-6.
- Qingyi Z., Lin Y., Junhong W., Jian S., Weizhou H., Long M., Zeyu S., & Xiaojian G. (2009). Unfavorable prognostic value of human PEDF decreased in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: a differential proteomics approach. *Cancer Invest* 27: 794-801.
- Ramirez-Castillejo C., Sanchez-Sanchez F., Andreu-Agullo C., Ferron SR., Aroca-Aguilar JD., Sanchez P., Mira H., Escribano J., & Farinas I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9: 331-9.
- Rey S., & Semenza GL. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 86: 236-42.
- Ria R., Reale A., Castrovilli A., Mangialardi G., Dammacco F., Ribatti D., & Vacca A. (2010). Angiogenesis and progression in human melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010: 185687.
- Rofstad EK., Henriksen K., Galappathi K., & Mathiesen B. (2003). Antiangiogenic treatment with thrombospondin-1 enhances primary tumor radiation response and prevents

- growth of dormant pulmonary micrometastases after curative radiation therapy in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 63: 4055-61.
- Rofstad EK., Galappathi K., & Mathiesen B. (2004). Thrombospondin-1 treatment prevents growth of dormant lung micrometastases after surgical resection and curative radiation therapy of the primary tumor in human melanoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 493-9.
- Sahai E., & Marshall CJ. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5: 711-9.
- Sahai E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15: 87-96.
- Sanz-Moreno V., Gadea G., Ahn J., Paterson H., Marra P., Pinner S., Sahai E., & Marshall CJ. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135: 510-23.
- Sasaki Y., Naishiro Y., Oshima Y., Imai K., Nakamura Y., & Tokino T. (2005). Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* 24: 5131-6.
- Seftor EA., Meltzer PS., Schatteman GC., Gruman LM., Hess AR., Kirschmann DA., Seftor RE., & Hendrix MJ. (2002). Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 44: 17-27.
- Seftor EA., Brown KM., Chin L., Kirschmann DA., Wheaton WW., Protopopov A., Feng B., Balagurunathan Y., Trent JM., Nickoloff BJ., Seftor RE., & Hendrix MJ. (2005). Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* 65: 10164-9.
- Seftor EA., Meltzer PS., Kirschmann DA., Margaryan NV., Seftor RE., & Hendrix MJ. (2006). The epigenetic reprogramming of poorly aggressive melanoma cells by a metastatic microenvironment. *J Cell Mol Med* 10: 174-96.
- Shackleton M., & Quintana E. (2010). Progress in understanding melanoma propagation. *Mol Oncol* 4: 451-7.
- Simonovic M., Gettins PG., & Volz K. (2001). Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11131-5.
- Slingluff CL, Jr., Vollmer RT., Reintgen DS., & Seigler HF. (1988). Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg* 208: 150-61.
- Steele FR., Chader GJ., Johnson LV., & Tombran-Tink J. (1993). Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1526-30.
- Streck CJ., Zhang Y., Zhou J., Ng C., Nathwani AC., & Davidoff AM. (2005). Adeno-associated virus vector-mediated delivery of pigment epithelium-derived factor restricts neuroblastoma angiogenesis and growth. *J Pediatr Surg* 40: 236-43.
- Takenaka K., Yamagishi S., Jinnouchi Y., Nakamura K., Matsui T., & Imaizumi T. (2005). Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci* 77: 3231-41.
- Tammela T., & Alitalo K. (2010). Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 140: 460-76.

- Taniwaki T., Becerra SP., Chader GJ., & Schwartz JP. (1995). Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem* 64: 2509-17.
- Tatzel J., Poser I., Schroeder J., & Bosserhoff AK. (2005). Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res* 18: 92-101.
- Tombran-Tink J., & Johnson LV. (1989). Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1700-7.
- Tombran-Tink J., Shivaram SM., Chader GJ., Johnson LV., & Bok D. (1995). Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 15: 4992-5003.
- Tombran-Tink J., Aparicio S., Xu X., Tink AR., Lara N., Sawant S., Barnstable CJ., & Zhang SS. (2005). PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains. *J Struct Biol* 151: 130-50.
- Tombran-Tink J. (2010). PEDF in angiogenic eye diseases. *Curr Mol Med* 10: 267-78.
- Topczewska JM., Postovit LM., Margaryan NV., Sam A., Hess AR., Wheaton WW., Nickoloff BJ., Topczewski J., & Hendrix MJ. (2006). Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* 12: 925-32.
- Tresini M., Pignolo RJ., Allen RG., & Cristofalo VJ. (1999). Effects of donor age on the expression of a marker of replicative senescence (EPC-1) in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 179: 11-7.
- Uong A., & Zon LI. (2010). Melanocytes in development and cancer. *J Cell Physiol* 222: 38-41.
- Utikal J., Schadendorf D., & Ugurel S. (2007). Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res* 298: 469-77.
- Villanueva J., & Herlyn M. (2008). Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep* 10: 439-46.
- Volpert OV. (2000). Modulation of endothelial cell survival by an inhibitor of angiogenesis thrombospondin-1: a dynamic balance. *Cancer Metastasis Rev* 19: 87-92.
- Volpert OV., Zaichuk T., Zhou W., Reiher F., Ferguson TA., Stuart PM., Amin M., & Bouck NP. (2002). Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 8: 349-57.
- Weeraratna AT. (2005). A Wnt-er wonderland--the complexity of Wnt signaling in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24: 237-50.
- Xi Y., Nakajima G., Hamil T., Fodstad O., Riker A., & Ju J. (2006). Association of insulin-like growth factor binding protein-3 expression with melanoma progression. *Mol Cancer Ther* 5: 3078-84.
- Xu X., Zhang SS., Barnstable CJ., & Tombran-Tink J. (2006). Molecular phylogeny of the antiangiogenic and neurotrophic serpin, pigment epithelium derived factor in vertebrates. *BMC Genomics* 7: 248.
- Yabe T., Wilson D., & Schwartz JP. (2001). NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 276: 43313-9.
- Yamagishi S., Inagaki Y., Nakamura K., Abe R., Shimizu T., Yoshimura A., & Imaizumi T. (2004). Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-

- 6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol* 37: 497-506.
- Yang H., & Grossniklaus HE. (2010). Constitutive overexpression of pigment epithelium-derived factor inhibition of ocular melanoma growth and metastasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 28-34.
- Yasui N., Mori T., Morito D., Matsushita O., Kourai H., Nagata K., & Koide T. (2003). Dual-site recognition of different extracellular matrix components by anti-angiogenic/neurotrophic serpin, PEDF. *Biochemistry* 42: 3160-7.
- Zaichuk TA., Shroff EH., Emmanuel R., Filleur S., Nelius T., & Volpert OV. (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* 199: 1513-22.
- Zbytek B., Carlson JA., Granese J., Ross J., Mihm MC., & Slominski A. (2008). Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol* 3: 569-585.